

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marko Malivuk, apsolvent

Diplomski studiji Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

AKLIMATIZACIJA I UKORJENJIVANJE BOROVNICE

(Vaccinium corymbosum L.) EX VITRO

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marko Malivuk, apsolvent

Diplomski studiji Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

AKLIMATIZACIJA I UKORJENJIVANJE BOROVNICE

(Vaccinium corymbosum L.) EX VITRO

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, predsjednik
2. prof. dr. sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
2.PREGLED LITERATURE.....	2
2.1. Borovnica (lat. <i>Vaccinium corymbosum</i> L.).....	2
2.2. Sistematika i podjela borovnice po vrstama.....	5
2.3. Morfologija borovnice.....	10
2.4. Proizvodnja borovnice u svijetu.....	16
2.5. Tehnologija i proizvodnja borovnice u RH.....	18
2.6. Razmnožavanje borovnice.....	19
2.6.1. <i>Generativno razmnožavanje</i>	20
2.6.2. <i>Vegetativno razmnožavanje</i>	21
2.7. Razmnožavanje borovnice <i>in vitro</i> s pregledom dosadašnjih istraživanja.....	24
3. MATERIJALI I METODE.....	31
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva.....	31
3.2. Kultivar u istraživanju.....	32
3.3. Tretmani u istraživanju.....	34
3.4. Priprema eksplantata, disekcija i prenošenje izdanaka na supstrat (<i>ex vitro</i>).....	35
3.5. Mjerenja u istraživanju.....	36
3.6. Obrada podataka.....	37
4. REZULTATI.....	38
4.1. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – Kontrola.....	38
4.2. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – IBA.....	39
4.3. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – Prah.....	41
5. RASPRAVA.....	44
5.1. Razlike između tretmana citokininima unutar korištenog tipa posude.....	45
5.2. Razlike između korištenih posuda sa supstratom po tretmanima.....	46
6. ZAKLJUČAK.....	50

7. POPIS LITERATURE.....	52
8. SAŽETAK.....	59
9. SUMMARY.....	60
10. POPIS TABLICA.....	61
11. POPIS SLIKA.....	62
12. POPIS GRAFIKONA.....	64
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	65
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	66

1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) jedna je od vrlo važnih voćnih kultura s visokom vrijednosti kako na globalnom tako i na domaćem tržištu voća. Pripada voćnoj vrsti čiji je intenzivni uzgoj započeo dosta kasno, a u RH nema veliku tradiciju uzgoja. Posjeduje visoku nutritivnu vrijednost. Svjedoci smo posljednjih godina o podizanja vrijednosti borovnice po pitanju ljudskog zdravlja putem medija. Mediji ju predstavljaju kao funkcionalna hrana, odnosno „supervoće“ koje ima vrlo povoljan učinak na ljudsko zdravlje, posebice zbog svog visokog sadržaja antocijana (jedan od najmoćnijih antioksidanata) i fenola koji pomažu u sprječavanju pojave nekih bolesti. Posljednjih godina zabilježen je trend povećanja površina pod intenzivnim nasadima borovnice u RH. Sve je veći trend podizanja novih ili rekonstrukcije postojećih nasada borovnice, a najvećim dijelom rezultat su politike mjera ruralnog razvoja, poticanja mladih poljoprivrednika i gospodarstava, odnosno zajedničkih potpora RH i EU. Uslijed navedenoga pojavile su i povećane potrebe za certificiranim i zdravim sadnim materijalom.

Razmnožavanje putem *in vitro* modela (kultura tkiva, mikropropagacija) predstavlja suvremenu biotehnološku metodu masovne proizvodnje genetski identičnih, fiziološki uniformnih i zdravih biljaka. Prednosti su višestruke, manje potrebe za proizvodnom površinom, kratak vremenski interval proizvodnje, manja količina početnog inicijalnog baznog materijala, dugo čuvanje klonskog materijala, prenošenje, itd. Učinkovitost mikropropagacije borovnice uvelike ovisi i o genotipu, različitim koncentracijama regulatora rasta i hraniva, a napose pravilnoj, odnosno uspješnoj aklimatizaciji i rizogenezi borovnice. Ukorjenjivanje i aklimatizacija borovnice predmet je mnogih istraživanja u standardizaciji protokola *in vitro* propagacije borovnice.

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost aklimatizacije i ukorjenjivanja eksplantata visokogrmolike borovnice *Bluecrop* uporabom određenih hormona na dva tipa posuda sa supstratom.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Borovnica (*lat. Vaccinium corymbosum L.*)

Borovnica je biljka iz porodice *Vaccinium* (Slika 1). One su raznovrsna skupina trajnica, uglavnom drvenastih grmova, koji donosi plodove u grozdovima. Pojavljuje se kao mali višegodišnji grm koji naraste između 10 i 60 cm, ponekad i do 90cm. Koriijen borovice je zelene boje a izbija iz rizoma, dok su listovi ovalni ili eliptični, dugački od 1 – 3 cm. Borovnica je listopadna biljka, novi listovi izbijaju krajem travnja odnosno početkom svibnja, a opadaju krajem rujna. Plod borovnice dozrijeva od kraja svibnja do srpnja, ovisno o nadmorskoj visini i položaju. Svježi i zreli plodovi uglavnom su ljubičaste boje, a ponekad mogu biti i tamnije, gotovo crne. U Hrvatskoj borovnica najviše raste na Velebitu i Gorskom Kotaru, no ima je i na Medvednici, Žumberku, Papuku, Psunju te Ivanšćici.

Borovnica sadrži oko 400 vrsta, jedna ili više su domaće na svim kontinentima osim na Antartici i Australiji te na otocima koji su daleko od kopna. Najčešće uspijeva na kiselom, pjeskovitom i organskom tlu. (Vander Kloet, 1988; Ballington, 2001)

Plodovi borovnice sadrže visoku razinu vitamina C, celuloze i pektina, te stvaraju antocijanine (Stark i sur., 1978; Sapers i Hargrave, 1987; Hong i Wrolstad, 1990) koji imaju važne terapijske vrijednosti.

Većina kultiviranih borovnica uzgaja se u SAD-u i Kanadi (Galletta and Ballington, 1996).

Borovnica je otporna na zimu te može podnijeti temperature od -20 °C do -25 °C bez ikakvih šteta, a ako je prekrivena snijegom može izdržati i puno niže temperature. Kod nekih sorata pupovi su otporni do -35°C. Zanimljivo je da je otpornost na mraz povezana s nastankom bjelančevina u pupovima koje nazivamo Dehydrin-proteinima koji također nastaju i za vrijeme suša i služe kao 'biomarkeri' za toleranciju na stres. Dok je u pitanju suša, borovnica je jako osjetljiva stoga joj treba osigurati dovoljni vlage kako bi se izbjegle štete kao što su kržljav rast, slabiji urod, a u najgorem slučaju grmovi se mogu osušiti. Zahtijevaju 600 do 1000 mm padalina godišnje. Tlo pogodno za borovnicu je ono kiselo, pH 4 – 5,2, međutim uspjeti će i na vapnenom tlu ali samo ako postoji dovoljno dubok sloj kiselog humusa. Za podizanja nasada najbolja su tla s blagim nagibom kako bi se odvijala stalna cirkulacija zraka, odgovaraju joj topliji i osunčani položaji.

Budući su genetski heterozigotne, borovnice ne razmnožavaju jedinke iz sjemena sličnih roditelju. Tradicionalno se brusnice pa i borovnice razmnožavaju vegetativno, što

osigurava genetske karakteristike kakve uzgajivači žele i brzo se postiže plodonosno stanje.

Borovnica je ljekovita biljka sa ukusnim plodovima i ima svoju namjenu kako u medicini tako i u kulinarstvu. Plodovi su bogati željezom i vitaminima. Postoji više načina pripreme borovnice u ljekovite i kulinarske svrhe. Najčešće se koristi za pripremanje čajeva, sokova i marmelada. Ljekoviti dijelovi biljke su i listovi, plodovi i korijen, koji se prebira prije sazrijevanja plodova i suše na sjenovitom i zračnom mjestu. Plodovi se prikupljaju ljeti i suše se na suncu. Medicinska upotreba borovnice je za: aterosklerozu, insuficijenciju jetre i žuči, dijareju, dijabetes, dizenteriju i probleme s cirkulacijom.

Postoji širok spektar sorti borovnice, neke od njih su Duke, Spartan, Herbert, Bluecrop, Yersey, Elizabeth i mnoge druge.



Slika 1. Borovnica (Izvor: Internet¹)

Plod borovnice ima izvanredne hranjive, farmaceutske, dijetetske i tehnološke vrijednosti, što ga čini pogodnim za potrošnju u svježem stanju, sušenje, zamrzavanje i pripremanje raznih drugih prerađevina kao što su kompoti, marmelade, sokovi i dr. Hranjiva i ljekovita vrijednost plodova borovnice očituje se u sadržaju pojedinih tvari; ugljikohidrata, kiselina, mineralnih soli, fenola i vitamina. Plod borovnice ima visok sadržaj šećera (6,5-8 % i više). S druge strane, kiselost je ograničena sa prosječnim sadržajem ukupnih kiselina 1,00 do

2,97%, tako da se plodovi odlikuju veoma visokim glukoacidmetrijskim koeficijentom (5 do 15). pH vrijednost plodova borovnice se kreću u rasponu od 2,75 do 3,25. (Tablica 1.)

Tablica 1. Kemijski sastav ploda borovnice (Ciesielska, 2000.)

BOROVNICA	Jedinica	Vrijednost
Ugljikohidrati	%	6,44-8,33
Fruktoza	%	3,06-5,00
Glukoza	%	2,44-4,06
pH		2,75-3,25
Ukupne kiseline	%	1,00-2,97
Limunska kiselina	%	0,51-1,06
Jabučna kiselina	%	0,00-0,30
Bjelančevine ukupno	%	0,63-1,33
Aminokiseline ukupno	mg/100g	0,64-12,86
Pepeo	%	0,20-0,28
Kalij	mg/kg	585-150
Fosfor	mg/kg	114-291
Kalcij	mg/kg	95-255
Magnezij	mg/kg	46-80

Zahvaljujući značajnom sadržaju fenolnih jedinca plodovi borovnice se odlikuju visokim antioksidativnim kapacitetom i ističu po svom rastućem potencijalu održavanja zdravstvenog statusa, odnosno odlaganja nastupanja različitih kroničnih oboljenja. Fenolne jedinice imaju karakteristike „hvatača slobodnih radikala“, koji ugrožavaju integritet staničnih struktura i normalan tok metaboličkih procesa.

Antocijani, kao prirodni pigmenti odgovorni za plavu, ljubičastu i crvenu boju ploda, u značajnijoj količini su zastupljeni u plodu samonikle šumske borovnice (Lohachompol i sur., 2004). To su potvrdila istraživanja Milivojević (2008), izvedena na plodovima šumske borovnice izdvojene iz prirodne populacije na planini Javoru, prema kojima je sadržaj ukupnih antocijana u soku iznosio 1,297 g/l. Dobivena vrijednost je bila tri puta veća u usporedbi s vrijednostima dobivenim kod sorti američke borovnice. U plodovima američke borovnice pronađeno je ukupno 15 antocijana svrstanih u 5 kategorija svih mogućih kombinacija sa tri vrste šećera; galaktoza, glukoza i arabinoza. Najzastupljeniji su bili monoglikozidni oblici antocijana: malvidin 3-galaktozid, delfinidin 3-galaktozid, delfinidin 3-glukozid, cijanidin 3-galaktozid i dr. (Szajdek i Borowska, 2008).

2.2. Sistematika i podjela borovnice po vrstama

Borovnica zauzima sljedeće mjesto u sistematici biljaka:

Carstvo: *Plantae*

Divizija: *Magnoliophyta*

Razred: *Magnoliopsida*

Red: *Ericales*

Porodica: *Ericaceae*

Rod: *Vaccinium*

Vrsta: *V. myrtillus*

Smatra se da u svijetu postoji oko 400 vrsta roda *Vaccinium* L. (Luby i sur., 1990; Galletta i Ballington, 1996)

U stvaranju plemenitih sorti borovnice sudjelovalo je 19 vrsta iz Sjeverne Amerike, koje pripadaju sekciji *Cyanococcus* A. Gray roda *Vaccinium* L., a među njima najveći značaj pripada sljedećim vrstama:

1. *Vaccinium myrtilloides* Michaux (kanadska gorka niskogrmolika borovnica),
2. *V. angustifolium* Aiton (niskogrmolika borovnica),
3. *V. corymbosum* L. (sjeverna visokogrmolika borovnica),
4. *V. australe* Small (jugoistočna visokogrmolika borovnica),

5. *V. ashei* Reade (borovnica „zečje oko“).

Pored njih, potencijalni značaj u oplemenjivanju borovnice ima i obična borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.), koja pripada sekciji *Myrtillus* Dumort roda *Vaccinium* L., a rasprostranjena je na sjevernoj Zemljinoj polutci (Europa, Azija i Sjeverna Amerika).

Kanadska gorka niskogrmolika borovnica (*Vaccinium myrtilloides* Michaux) - rasprostranjena je sjeverno od 350 sjeverne geografske širine u Sjevernoj Americi. Grm *Vaccinium myrtilloides* je nizak i dlakav, a listovi su također dlakavi i eliptični. Cvjetovi su bijeli i cilindrično zvonasti, a plodovi su sitni, plavi, i kiselog okusa. Razmnožava se reznicama. Susreće se u močvarnim područjima te planinskim livadama.



Slika 2. Kanadska gorka niskogrmolika borovnica (Izvor: Internet²)

Niskogrmolika borovnica (*Vaccinium angustifolium* Aiton) - Podrijetlo vrste *Vaccinium angustifolium* je centralni i istočni dio Sjeverne Amerike. Formira nizak grm bez dlaka, može se sresti na zemljištima koja su do nedavno bila korištena kao livade. Otporna je na

zimske mrazeve. Listovi su sivkasto zeleni, glatki i eliptični, cvjetovi su bijeli i cilindrični, a plodovi sitni, svijetloplavi ili crni, slatkastog okusa. (Slika 3.)

Proučavanjem ove vrste na njenom prirodnom staništu može se zaključiti da je došlo do introgresije (proces u kojem se geni jedne vrste uključuju u genetski sadržaj druge) sa drugim vrstama iz sekcije *Cyanococcus*, što je dalje rezultiralo značajnim brojem varijacija koje danas promatramo unutar vrsta (Ballington, 2009).

Križanjem vrsta *Vaccinium corymbosum* i *V. angustifolium* dobivene su sorte borovnice srednje visine grma.

U Kanadi i sjeveroistočnim dijelovima SAD-a plodovi ove vrste se beru i koriste u komercijalne svrhe, primarno za potrebe prerađivačke industrije (više od 97%).



Slika 3. Niskogrmolika borovnica (Izvor: Internet³)

Sjeverna visokogrmolika borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) - Podrijetlo vrste *Vaccinium corymbosum* je Sjeverna Amerika. Raste na kiselim zemljištima u močvarama i na tresetištima. Teško podnosi sušu. Grm je visok od 1 do 3 metra, listovi su sivkasto

zeleni, glatki, eliptično jajasti ili jajasti, cvjetovi su potpuni, bijelo ružičasti i cilindrični, a plodovi su loptaste bobice, plave ili crne boje, kiselkasti, aromatični i ukusni (Slika 4).

Križanjem u okviru *V. corymbosum*, kao i međuvrskom hibridizacijom *V. corymbosum* sa drugim vrstama borovnice stvorena je većina sorti visokogrmolike borovnice koje se danas uzgajaju u svijetu.



Slika 4. Sjeverna visokogrmolika borovnica (Izvor: Internet⁴)

Jugoistočna visokogrmolika borovnica (*V. australe* Small) - Podrijetlo vrste *Vaccinium australe* je jugoistočni dio SAD-a. Raste na močvarnim zemljištima. Grm je visok od 2 do 4 metra, listovi su sivkasto zeleni, eliptično jajasti, cvjetovi su bijeli i cilindrični, a plodovi sitno plavi i ukusni.

Borovnica „zečje oko“ (*Vaccinium ashei* Reade) - Podrijetlo vrste *Vaccinium ashei* je priobalje Meksičkog zaljeva u Sjevernoj Americi, gdje se uzgaja na oko 4.500 ha, sa proizvodnjom od 8000 tona godišnje. Raste u divljem stanju na riječnim dolinama, prorijeđenim šumama i napuštenim poljima. Zimzelena je biljka. Formira vrlo bujan grm

(5-6 metara), dugovječan i rodan. Podnosi sušu, toplinu i različita zemljišta, a zahtjeva oko 400 sati hladnog perioda godišnje. Listovi su sivkasto zelene do tamnozeleno boje, dok su cvjetovi blijede do svijetlo ružičaste boje. Plodovi su sitne do srednje krupne bobice, čvrstog mezokarpa i kiselog su okusa (Slika 5).



Slika 5. Borovnica „zečje oko“ (Izvor: Internet⁵)

Obična (šumska) borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) - Ova vrsta borovnice je najznačajnija borovnica u četinastim i mješovitim četinsto-listopadnim šumama i na visokim planinama. Pronalazi se iznad granica šuma, u području visoko planinskih grmova i tresetišta. Izgledom je nizak i razgranat grm. Lišće je sitno, izduženo jajasto, slabo dlakavo, a cvjetovi su potpuni i razvijaju se u pazušcu lista. Fenofaza cvjetanja nastupa u periodu od sredine svibnja do sredine lipnja, a sazrijevanje počinje krajem srpnja i početkom kolovoza ovisno o nadmorskoj visini i klimatskim karakteristikama područja (Mratinić i Kojić, 1998), (Slika 6).



Slika 6. Obična borovnica (Izvor: Internet⁶)

2.3. Morfologija borovnice

Borovnice su višegodišnje, grmolike biljke kritosjemenjače, čija se visina kreće od 30 cm do 9 m, ovisno o vrsti, sorti, uvjetima i načinu uzgoja.

Niskogrmolike borovnice, *V. myrtilloides* i *V. angustifolium*, ne prelaze visinu od 1 m. Visokogrmolike borovnice, *V. corymbosum*, *V. australe*, *V. ellioti*, *V. simulatum*, *V. marianum*, *V. arkansanum* i druge imaju visinu grma od 1,5 do 7 m.

Borovnice srednje visine grma nastale su križanjem nisko i visokogrmolikih borovnica.

Korijen - Korijenov sustav visokogrmolikih borovnica je površinski i difuzan. Prostire se na dubini 10-15 cm. Uglavnom se sastoji od vrlo finih končastih korjenova, bez korijenovih dlačica. Stoga je njegov kapacitet apsorpcije znatno smanjen. (Slika 7)

Endotrofnom mikorizom povećava se apsorpcijska moć korijena borovnice, zbog čega je on obogaćen mikoriznim gljivicama. Njihovo prisustvo ima važnu ulogu u ishrani

borovnice. Najveća korist od simbioze sa gljivicama je povećan unos dušika, apsorpcija slabo pokrenutih čestica minerala iz tla, a u slučaju viška čestice se akumuliraju u njihovim stanicama čime se sprječava njihov transport i toksični utjecaj na biljku.

Veći dio korijenovog sustava niskogrmolikih borovnica je adventivno korijenje. Korijen vrste *V. angustifolium* prodire dosta duboko u tlo i igra značajnu ulogu u apsorpciji vode i hranjivih elemenata.



Slika 7. Korijen borovnice (Izvor: Internet⁷)

Stablo - Sve vrste koje pripadaju rodu *Vaccinium* L. razvijaju se kao polugrmovi ili grmovi. Podzemni rizomi predstavljaju veći dio stabla niskogrmolikih borovnica, dok snažni nadzemni izdanci grade grm kod visokogrmolikih borovnica. (Slika 8)

Grmovi ovise od vrste i sorte pa imaju različitu visinu – od nekoliko desetaka centimetara do nekoliko metara. Grančice su uglaste ili valjkaste, gole ili prekrivene dlačicama.

Stablo borovnice ima debelu kutikulu koja pokriva jednoslojnu epidermu. U epidermi sjeverne visokogrmolike borovnice nalaze se stome. Unutrašnjost stabla ispod epiderme zauzima kora koja se sastoji od 5 do 12 redova čvrsto zbijenih stanica sa klorofilnim zrnima. U centralnom dijelu stabla borovnice nalaze se kanali za provođenje zraka.



Slika 8. Stablo borovnice (Izvor: Internet⁸)

List - Listovi borovnice su naizmjenično raspoređeni na stablu. Većina vrsta borovnice, kao što su *V. angustifolium* i *V. corymbosum* su listopadne. Borovnice koje potječu iz toplijeg podneblja *V. darrowii*, *V. myrsinitesi* i *V. ashei* su zimzelene. (Slika 9)

Dužina lista niskogrmolikih vrsta borovnice kreće se od 0,7 do 3,5 cm, a kod visokogrmolikih vrsta može dostići 8 cm.

Listovi borovnice najčešće su eliptičnog oblika, što je karakteristično za vrste *V. myrtilloides* i *V. angustifolium*. List visokogrmolike borovnice *V. corymbsum* pokriven je dlačicama.

Lice i naličje lista prikriveni su jednoslojnom epidermom. U epidermi naličja lista nalazi se 231 do 295 stoma po mm². Ispod epiderme lica lista nalazi se palisadno tkivo sastavljeno od jednog sloja stanica, a ostatak mezofila zauzima spužvasto tkivo sa brojnim prostorima ispunjenim zrakom.



Slika 9. List borovnice (Izvor: Internet⁹)

Cvijet - Cvjetovi borovnice su pojedinačni ili grupirani u grozdaste cvati. Po 6 do 14 cvjetova grade jednu cvat, pri čemu se prvo formiraju cvjetovi u osnovi cvati. (Slika 10)

Cvjetovi su potpuni, sastoje se iz 5 čašičnih listića zelene boje, 4 do 5 kruničnih listića bijele ili ružičaste boje, 8 do 10 prašnika i 1 tučka. Krunični listići su srasli i oblikuju lopataste, cilindrične ili zvonaste krunice. Pri osnovi kruničnih listića nalaze se žlijezde koje luče nektar. Prašnici se sastoje od prašničke niti i dvije izdužene prašnice, koje se otvaraju prema vrhu i rasprostiru pelud. U toku mikrosporogeneze stvaraju se tetrade peludi. Jezgra svakog peludnog zrnca dijeli se na vegetativnu i generativnu stanicu oko 15 dana poslije formiranja tetrada, pa ih vjetar ne može lako nositi.

Tučak borovnice se sastoji od plodnice koja je pregradama podijeljena na 10 dijelova, njuške i tučka. Prašnici su kraći od njuške i tučka.



Slika 10. Cvijet borovnice (Foto: Malivuk, 2019.)

Plod i sjeme - Plod borovnice je sočna bobica, čiji se perikarp sastoji iz: egzokarpa i mezokarpa unutar koga su inkorporirane sjemenke. Endokarp nije izdiferenciran. (Slika 11).

U plodu borovnice nalazi se do 65 sjemenki, od kojih je većina nepotpuno razvijena. Broj sjemenki je u direktnoj vezi s veličinom ploda, ali još nije pouzdano otkriveno da li ova korelacija varira iz godine u godinu i kako utječe na godišnji prinos. Prema istraživanjima Ehlenfeldt i Martin (2009) utvrđen je pozitivan trend između mase ploda i broja sjemenki u plodu kod sorte Bluecorp, ali je istovremeno utvrđeno smanjenje mase bobica i broja

sjemenki u njima između prve i treće berbe. Kod heksaploidnih sorti sjemenke su krupnije nego kod diploidnih i tetraploidnih sorti borovnice.

Plod borovnice najčešće je okruglasto-spljoštenog oblika, tamnoplave ili ljubičaste boje, sa jasno izraženim ostacima čašice na vrhu. Često je prekriven pepeljastom prevlakom.

Antocijani, kao prirodni pigmenti, rezultiraju pojavom plave boje. Oni su prisutni u pokožici i u nekoliko slojeva ispod nje kod sorti visokogrmolike borovnice ili u čitavom perikarpu.

U tijeku sazrijevanja ploda povećava se sadržaj pigmenta antocijana, kao i sadržaj otopljenih suhih tvari od 7% u zelenom do 15% u zreлом plodu pred berbu. Plodovi nastavljaju sazrijevati i poslije berbe, a time se povećava i sadržaj otopljenih suhih tvari.

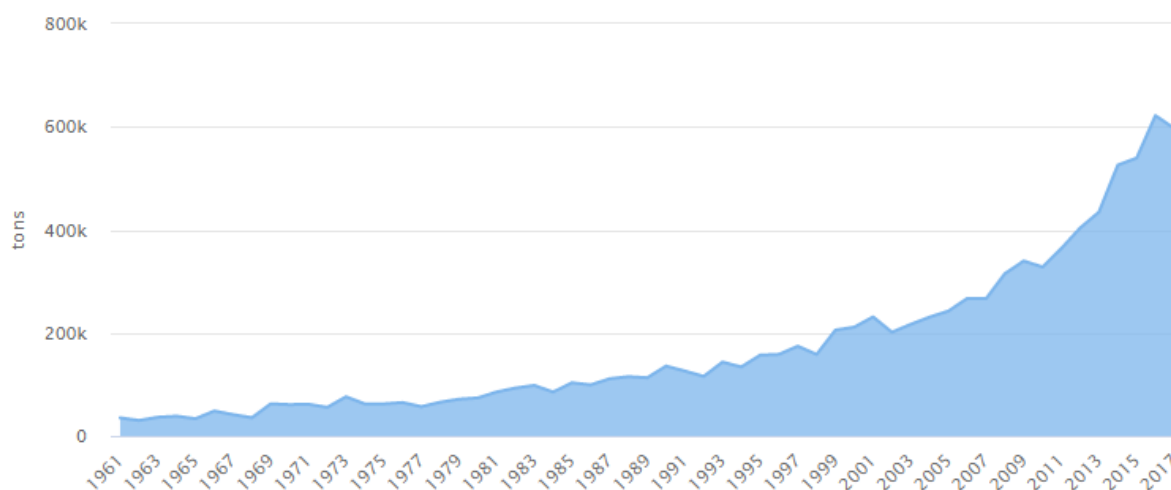


Slika 11. Plod borovnice (Foto: Malivuk, 2019.)

2.4. Proizvodnja borovnice u svijetu

Borovnica se počela proizvoditi relativno kasno. Dr. F.V. Coville (1888-1937) započeo je uvođenje samonikle borovnice u kulturu 1906. godine, a rad na planskoj hibridizaciji počeo je 1913. godine. Do svoje smrti stvorio je 15 sorti borovnice.

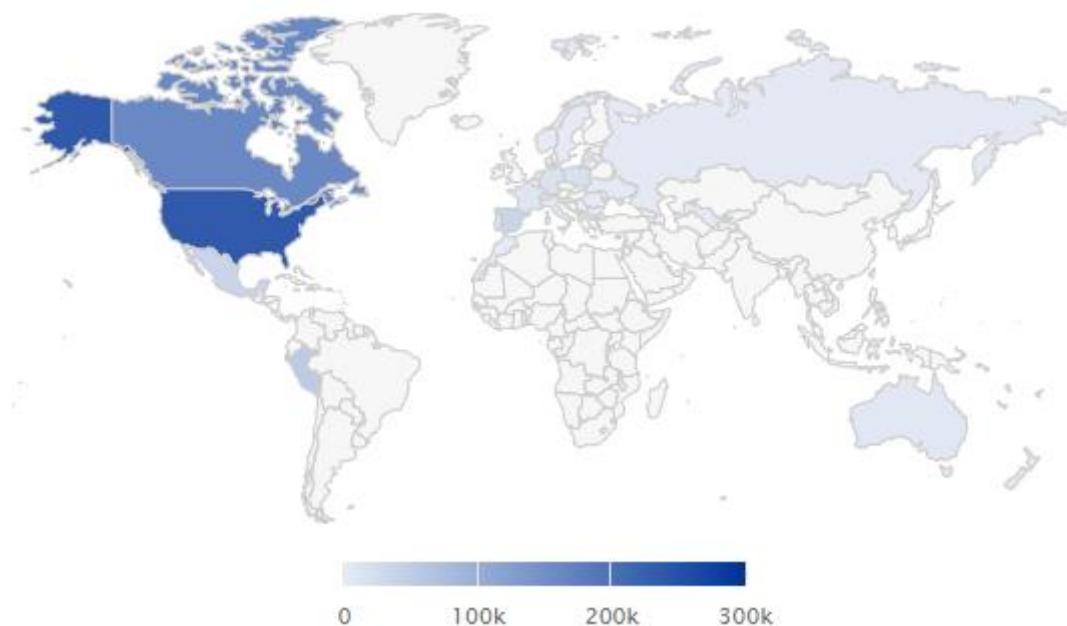
Od 2017. godine proizvodnja borovnice ima znatan rast u odnosu na godine prije. Borovnica postaje vrlo popularna svugdje u svijetu, najviše u SAD-u, Kanadi i Čileu te Europi odnosno u Poljskoj, Gruziji, Rumunjskoj, Ukrajini, Litvi (Grafikon 1). Također posljednjih je godina i u Hrvatskoj zabilježen veći interes i porast proizvodnih nasada borovnice. U Ukrajini je borovnica najpopularnija vrsta, čak 2200 ha je pod borovnicom. 2018. godine je tamo proizvedeno 4500 tona od čega je barem 85% izvezeno, većinom u Bjelorusiju, Poljsku i Nizozemsku. Proizvodnja borovnice i dalje raste te se smatra da će Ukrajina do kraja ove godine imati plantaže površine preko 3000 ha.



Grafikon 1. Proizvodnja borovnice u svijetu od 1961 do 2017 god. (Izvor: FAOSTAT)

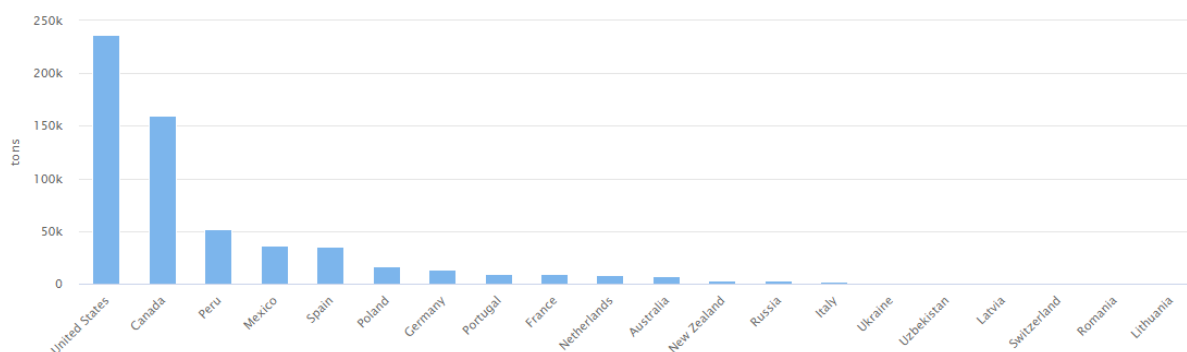
Danas su lideri proizvodnje ovog zdravog voća Poljska (12.700t/god), Njemačka (10.300t/god), Francuska (9.000t/god), Nizozemska (5.500t/god) i Španjolska (5.000t/god) (Grafikon 3).

Primjerice, Azija ima brzorastuće tržište borovnica jer je tamo sezona borovnica koje se uzgajaju u zaštićenom prostoru od ožujka do svibnja, a na otvorenom od lipnja do kolovoza. Cijena borovnice pada zbog sve veće proizvodnje. Prije otprilike 5 godina, cijena 500 g borovnice u Kini iznosila je 20€ (Grafikon 2).



Grafikon 2. Karta proizvodnje borovnice (Izvor: FAOSTAT)

Kada govorimo o potrošnji borovnice, Velika Britanija je vodeća zemlja. Statistički gledano, svaki stanovnik Velike Britanije pojede 0,86 kg borovnice godišnje dok je europski prosjek 0,18 kg po osobi. U 2017. godini u Europi se pojelo 160.000 tona, od kojih je 105.000 tona proizvedeno u Europi, a ostale su došle iz Afrike, Čilea i Perua.



Grafikon 3. Top 20 zemalja proizvodnje borovnice u 2017 godini (Izvor: FAOSTAT)

Borovnica nema veliku tradiciju uzgoja na našem podneblju, ali ima određenu potrošnju. Na našem tržištu se konzumira relativno malo zbog nedostatka navika, ali i visokih cijena na policama. Proizvodnja borovnice u Hrvatskoj je veoma skromna, iako se sve češće može naći u investicijama IPARD-a i EAFRD fondova za ruralni razvoj. Međutim, proizvodnja je u porastu, no tržište je nedovoljno razvijeno tako da nije u fokusu interesa otkupljivača.

Zasad je borovnica u Hrvatskoj, Srbiji i Crnoj Gori dopunska kultura kako bi se uravnotežio proizvodni rizik kod lokalnih proizvođača.

Uzgoj borovnice počeo je u SAD-u 1893. godine, dok su u Hrvatskoj prve američke borovnice posađene 1964. godine (Dujmović i sur., 2007.).

2.5. Tehnologija i proizvodnja borovnice u RH

Borovnica zahtijeva odgovarajući raspored topline tijekom cijele godine i vegetacijskog razdoblja. Visokoprinosne sorte borovnice podnose hladnoću i do -28°C , pod uvjetom da su izdanci prekriveni snijegom.

Iako su u našoj zemlji relativno povoljni uvjeti za uzgoj borovnice, proizvodnja je zanemariva. Podizanjem novih nasada pored postojeće, angažirati će se i nova radna snaga, što će se povoljno odraziti na zapošljavanje. U našoj zemlji ima vrlo malo iskustava u uzgoju visokogrmolike borovnice. Od 70-tih godina prošlog stoljeća do danas činjeno je nekoliko pokušaja uvođenja u proizvodnju ove plemenite voćne vrste. Unatoč relativno povoljnim uvjetima rezultati su uglavnom bili nezadovoljavajući, tako da je i interes proizvođača bio zanemariv.

Intenzivna i profitabilna proizvodnja visokogrmolike borovnice podrazumijeva redovitu i obilnu rodnost i visoku kvalitetu ploda, kao i znatno veću vrijednost proizvodnje u odnosu na druge troškove. S obzirom da eksploatacijski vijek plantažno uzgojene borovnice iznosi 15 do 20 godina, a da podizanje zasada zahtijeva ulaganje velikih novčanih sredstava, zbog čega je neophodno, prije otpočinjanja investicija izvršiti detaljnu analizu agroekoloških i drugih uvjeta koji su relevantni za ovu proizvodnju na određenom prostoru.

Da bi se cvatnja i drugi biološki procesi normalno odvijali potrebno je da borovnica provede, tijekom zimskog mirovanja, određeno vrijeme na temperaturi nižoj od $7,2^{\circ}\text{C}$ (otprilike 650 do 850 sati). Nakon razdoblja zimskog mirovanja, uzgojene sorte relativno su osjetljive na zimske temperature, posebno ako temperatura varira između $+6^{\circ}\text{C}$ tijekom dana i -7°C tijekom noći. Niske temperature i nedovoljna suma topline utječu da plodovi neravnomjerno sazrijevaju ili da uopće ne sazriju. Sorte borovnice su osjetljive i na visoke temperature (iznad 30°C) u tijeku vegetacije, posebno ako se javljaju u fenofazama cvatnje i sazrijevanja plodova i ako dulje traju. Toplinski udari, koji se na nekim lokalitetima mogu javiti u toplim i vlažnim ljetima, mogu nanijeti izvjesne štete, pa čak i sušenje borovnice.

Za normalan razvoj, rodnost i postizanje optimalnih prinosa po jedinici površine, potrebno je da u nasadima borovnice tijekom vegetacije bude dovoljno vlage u tlu (75% -80%) i da prosječna relativna vlažnost zraka bude 75%. Kritični periodi za vlagu kod borovnice su u fenofazi cvatnje (svibanj), rasta i zrenja plodova (lipanj, srpanj, na višim terenima i kolovoz) i obrazovanja rodnog potencijala za narednu godinu (kolovoz).

Prisustvo obične borovnice je siguran pokazatelj povoljnosti nekog zemljišta za uzgajanje visokogrmolike borovnice. S obzirom da ova proizvodnja zahtijeva relativno male površine, potrebno je svaku parcelu pažljivo odabrati i izvršiti neophodnu pedološko-agrokemijsku analizu.

2.6. Razmnožavanje borovnice

Borovnica se može razmnožavati na više načina a jedan od načina je vegetativni odnosno ukorjenjivanjem zrelih reznica. Ovaj postupak se najlakše izvodi u stakleniku gdje je ujednačena temperatura i mogućnost zatamnjenja. U stakleniku je potrebno osigurati relativnu vlažnost zraka 75-80%. Reznice ne smiju biti izložene direktnim sunčevim zrakama, pogotovo u prvim tjednima te je potrebno osigurati zatamnjenje. Kontejnerski sistem razmnožavanja sadnica ima više prednosti od klasičnog, a pogotovo što se sadnja može obavljati duži vremenski period u godini i mnogo je bolji prijem sadnica.

Najpopularnija i najučinkovitija metoda razmnožavanja borovnice je mikropropagacija, u odnosu na druge metode jer osigurava zdravi i ujednačeni biljni materijal. (Meiners i sur. 2007, Masari 2009, Ružic i sur. 2012).

Genetska varijabilnost nastala tijekom mikropropagacije često se tumači kao utjecaj nekog stresa. Slične se promjene pojavljuju i nakon premještanje biljaka u uvjete *ex vitro*. (Burg i sur. 2007).

In vitro je također vrlo učinkovita metoda razmnožavanja. Dva su glavna razloga korištenja *in vitro* tehnologije u proizvodnji sadnog materijala, a najučinkovitija je metoda oslobađanja biljnog materijala od virusa i patogena. Certificirani sadni materijal dobiven ovom metodom nazivamo virus-free ili bezvirusni materijal., a drugi razlog korištenja ove tehnologije je vrlo brzo razmnožavanja biljaka neovisno o godišnjem dobu. Nakon uspješno postavljene aseptične kulture od jednog pupa može se u periodu od 6 mjeseci stvoriti cca 10 000-30 000 identičnih biljaka u prostoru od 10 m. Odnos cijena sadnica dobivenih tradicionalnim metodama uzgoja u usporedbi s *in vitro* sadnim materijalom je

neznatan, dok sa druge strane u pogledu kvaliteta, prinosa, otpornosti na vremenske prilike i bolesti je neusporediv. Poznato je iz iskustva da sadnice dobivene *in vitro* metodom uzgoja imaju brži razvoj i mnogo ranije postižu punu rodnost ili puni prinos.

2.6.1. Generativno razmnožavanje

Generativno razmnožavanje je razmnožavanje sjemenom. To sjeme je nastalo oplodnjom matične biljke iste vrste. Ova metoda razmnožavanja ima nedostatak u tom što često nije poznato kakva će svojstva imati biljka izrasla iz samog sjemena. (Slika 12)

Ako se radi o čistim sortama, a ne hibridnim nove biljke neće zadržati sve osobine matične biljke, dok kod hibridnih vrsta čovjek može kontrolirati koje će roditeljske osobine prenijeti na potomke. U oba slučaja se prenose osnovne genetske informacije o vrsti, no neke specifične osobine koje sama biljka posjeduje ponaosob mogu se kombinirati križanjem DNK dviju biljaka. Ova karakteristika može biti korisna ako se žele stvoriti neki novi zanimljivi oblici. Također, može biti i rizična jer se ne zna hoće li se neke željene osobine prenijeti na potomke.

Prednost generativnog razmnožavanja je ta što se može proizvesti velik broj biljaka koje su ujedno i otpornije na bolesti, sušu i niske temperature. Nedostatak ovakvog razmnožavanja je u tome što biljke kasnije cvjetaju nego one koje s razmnožavaju vegetativnim putem, samim time im se povećava i cijena.

Uspješnost ove vrste razmnožavanja ovisi o kvaliteti sjemena i uvjetima u kojima se razvija. S vremenom sjeme gubi klijavost, a razdoblje klijavosti, ovisno o vrsti iznosi od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. Klijavost sjemena ispituje se na način da se uzorak od 100 zrna postavi na vlažan papir, a broj izniklih predstavlja postotak klijavosti. Apsolutna težina sjemena je veličina koja se izražava težinom 100 ili 1000 sjemenki.



Slika 12. Sjeme borovnice (Izvor: Internet¹⁰)

2.6.2. Vegetativno razmnožavanje

Stvaranje korijena je ključni korak uspješnog vegetativnog razmnožavanja i razmještanja kulture. Ukorjenjivanje reznica odrađeno je interakcijom unutarnjih i okolišnih čimbenika. Na uspjeh razmnožavanja utječu starost i zdravstveno stanje, sezonski karakter, tehnika i uvjeti u okolišu.

Među najbitnijim unutarnjim čimbenicima je biljni hormon (auksin), odnosno dominantan regulator koji utječe na razvoja korijena (Overvoorde i sur. 2010). Neke sorte borovnice mogu spontano regenerirati korijenje na reznicama, dok druge zahtijevaju egzogenu primjenu auksina kao sredstva za promociju rizogeneze (Strik i sur., 1993.). Najzastupljeniji auksini u indukciju rizogeneze borovnice ali i ostalih *in vitro* voćnih kultura su indol-3-octena kiselina (IAA) i indol-3-maslačna kiselina (IBA) o tome nas izvještavaju Debnath 2005, Litwinczuk i sur., 2005, Meiners i sur., 2007.

U pokušaju poboljšanja ukorjenjivanja borovnica obavljena su istraživanja uporabom konjugata amino kiseline IBA i uspoređena s najčešće korištenim auksinima IBA i IAA. Amino konjugati IBA-e općenito su prihvaćeni kao oblici auksina koji sudjeluju u homeostazi tijekom razvoja biljke (Ludwig-Müller 2011). Koliko je poznato, ovo je prvo

izvješće o utjecaju konjugiranih auksina na ukorjenjivanje u rodu *Vaccinium*. U ovom istraživanju ispitan je učinak ukorijenjenosti IAA, IBA i IBA-Ala na reznice stabljike 4 sorte borovnica visoke sorte i uspoređen s onim dobivenim u mikropropagaciji.

Vegetativno razmnožavanje borovnice je najjednostavnija i najučinkovitija metoda da bi se dobile nove biljke. Predstavlja razmnožavanje biljaka pomoću dijelova vegetativnih organa (stabljike, lista i korijena). To je nespolni način razmnožavanja u kojem nastaju jedinke koje su genetički identične s roditeljskom biljkom. Biljka stvara neki oblik izdanka i ti dijelovi se otkidaju od roditeljske jedinke te se samostalno razvijaju. U nastanku nove biljke ne sudjeluju dva roditelja nego samo jedan pa mlada biljka koja nastaje bude jednaka njoj, naziva se i klon. Može se zaključiti da ovakvo potomstvo puno teže preživi nepovoljne uvjete koji se javljaju tijekom razvoja jer su svi genetički istovjetni pa su i jednako otporni na različite uvjete. Primjerice, ako uginu jedna biljka, uginuti će i ostale na tom području.

Vegetativno razmnožavanje koristi se u proizvodnji sadnog materijala. U praksi se najviše primjenjuje razmnožavanje zrelim i zelenim reznicama, i kulturom tkiva. U ograničenom broju i sa manjim uspjehom borovnica se može razmnožavati izdancima i položenicama.

Razmnožavanje zrelim reznicama - Ova metoda razmnožavanja je zastupljenija od metode razmnožavanja zelenim reznicama. (Slika 13) Obavlja se u staklenicima gdje je pored ujednačene temperature obavezno i zatamnjenje. Jednogodišnji ljetorasti, zdravi, dobro odrvenjeli i po mogućnosti bez cvjetnih pupoljaka uzimaju se u fazi dubokog mirovanja, najbolje krajem siječnja (Zec i sur., 2001). Ukoliko se reznice uzimaju ranije u prosincu ili početkom siječnja, treba ih čuvati u komorama na temperaturi 0 do 3°C u polietilenskim vrećicama kako ne bi dehidrirale. Ljetorasti debljine 6 do 12 mm skraćuju se na 12 do 15 cm dužine rezovima neposredno ispod donjeg i nekoliko milimetara iznad gornjeg pupoljka. Tako pripremljene reznice tretiraju se 0,1% otopinom Benomila, a zatim se bazni dio potapa u 0,2 % otopinu IBA u trajanju od 20 sekundi (Stanković, 1982). Podloga treba biti napravljena od mješavine perlita i kiselog taloga u odnosu 1:2, sa pH vrijednošću od 4,4. Debljina je 15 cm, a obavezno je bazno zagrijavanje na 18 do 20°C. Reznice se postavljaju na udaljenosti 10 x 5 cm i sa jednim do dva pupoljka iznad supstrata. Relativna vlažnost zraka u stakleniku treba biti od 75 do 80%. Reznice ne smiju biti izložene direktnim sunčevim zrakama posebno u prvim tjednima rizogeneze, pa se zbog toga moraju zamračiti. Treba nastojati da variranja temperature zraka i podloge budu što manja. Primjerom ove metode Zec i sur. (2001) dobili su prosječno 78,4% rizogenih reznica kod

sedam sorti visokogrmolikih borovnica, a najveći postotak imala je sorta Blueray – 86.7%. Kasniji termini uzimanja reznica nisu preporučljivi jer je rizogeneza daleko manja.

U toku naredne jeseni ili proljeća ukorijenjene reznice se vade iz podloge i sade u polje, gdje provode jednu ili dvije godine u cilju jačanja korijenovog sustava i čitave sadnice. Također, ukorijenjene reznice mogu se presađivati i u kontejnere, tresetne ili druge posude ili polietilenske vrećice, gdje provode jednu ili više godina do sadnje na stalno mjesto. Prednosti kontejnerskog uzgoja sadnica nad klasičnim je mogućnost sadnje skoro čitavu godinu i puno bolji prijem pri sadnji. U oba slučaja podloga za uzgoj sadnica mora biti perlit i kiseli talog sa kiselošću oko 4,5 uz omogućeno stalno vlaženje.



Slika 13. Razmnožavanje zrelim reznicama (Izvor: Internet¹¹)

Ukorjenjivanje zelenim reznicama - Ova metoda se primjenjuje kod borovnice sa promjenjivim uspjehom. Kod ove metode potrebno je ispuniti vrlo stroge uvjete u pogledu temperature (18 do 20°C), stalnog vlaženja (80 do 90%) i odgovarajućeg supstrata kiselosti 4,5.

Reznice se uzimaju od jednogodišnjih mladica iz tekuće vegetacije. One su dužine 10 do 12 cm sa donjim rezom odmah ispod koljenca i gornjim iznad posljednjeg pupoljka. Na vrhu reznice ostavljaju se dva lista reducirana na jednu trećinu površine. Poslije pripremanja reznice se potapaju baznim dijelom u 0,2% otopine IBA, a potom stavljaju u podlogu debljine 10 cm. U sanducima gdje se vrši ukorjenjivanje treba postojati bazno zagrijavanje sa stalnom temperaturom, a vlaženje se vrši automatski pomoću sustava za orošavanje. Poslije 3 do 4 tjedna dolazi do pojave kalusa, a zatim i korjenčića. U jesen ili rano proljeće biljke sa malim nježnim korijenom se presađuju u polje gdje provode 2 ili

više godine dok ne ojačaju. Također, mlade ukorijenjene biljke mogu se saditi u plastične vrećice ili tresetne kontejnere gdje nastavljaju ukorijenjivanje.

Uspjeh ukorijenjivanja zelenim reznicama je veći u dobro opremljenim ustanovama i velikim rasadnicima koji posjeduju suvremene staklenike sa automatskom opremom i solidnim iskustvom.

2.7. Razmnožavanje borovnice *in vitro* s pregledom dosadašnjih istraživanja

Mikropropagacija je postala pouzdani i rutinski način brzog multipliciranja biljaka koji se temelji na kulturi stanica biljaka, tkiva i organa na prilagođenom hranjivom mediju u sterilnom okruženju i kontroliranim uvjetima. Za *in vitro* proizvodnju biljaka važna je kvaliteta biljnog materijala i ekonomska isplativost (Anonymus 1, 2008).

Fokus mikrorazmnožavanja je na uzgoju sadnica biljnog materijala, ali pronalazi svoju svrhu i u raznim istraživanjima, krioprezervaciji ugroženih vrsta, pošumljavanju itd. (Anonymus 2, 2014).

Mikropropagacija se odvija u više faza. Nulta faza obuhvaća postupke prije početka same kulture, zatim slijedi uvođenje u kulturu, umnožavanje i reprodukcija. Prije završne faze gdje se biljčice prenose u zemlju obavlja se priprema kultura za prijenos (Jelaska, 1994).

Prednosti mikropropagacije nad klasičnim vegetativnim razmnožavanjem:

- Razmnožavanje *in vitro* mnogo je brže od razmnožavanja *in vivo*
- Moguće je razmnožavati i one biljke koje u uvjetima *in vitro* nije moguće
- biljke često rastu bolje i snažnije od biljaka kloniranih *in vivo*
- U kulturi tkiva razmnožavaju se samo zdrave biljke, postavljanje kulture može početi s odabranim i posebnim materijalom
- Prostor potreban za podizanje i razmnožavanje matičnih biljaka znatno se smanjuje upotrebom kulture *in vitro*
- Zahvaljujući optimalnim uvjetima omogućeno je precizno vremensko planiranje proizvodnje presadnica, čime se postiže proizvodnja kroz čitavu godinu
- Razmnožavanje *in vitro* omogućava zakorijenjavanja reznica pa je cijepljenje pupova na podlogu nepotrebno
- Nove sorte mogu se komercijalno brzo razmnožiti
- Omogućeno je brzo postavljanje roditeljskih klonova za stvaranje F1-hibrida

- Kultura *in vitro* posebno je korisna za osnivanje banke gena

Nedostaci mikropropagacije:

- Genetička stabilnost u nekim sustavima razmnožavanja *in vitro* je vrlo niska
- Nakon prijenosa u uvjete *in vivo* propagirane biljke mogu pokazati neke loše značajke
- Kod određenih biljaka zakorijenjavanja i prijenos u uvjete *in vivo* može biti zahtjevno
- Mikropropagirani genotip biljaka može biti osjetljiv na bolest ili uništen od patogenog organizma
- Regenerativna sposobnost može se izgubiti nakon određenog broja supkultura kalusnog tkiva ili stanica
- U nekim slučajevima sterilna izolacija eksplantata je vrlo teška (Jelaska, 1994)

Nekoliko je metoda mikropropagacije: metoda pojedinačnih nodijalnih segmenata, metoda aksilarnog pupanja (grananja), adventivnim izdancima i somatskom embriogenezom. Metodom aksilarnog pupanja vegetacijski se vršak izolira i na podlozi s relativno visokom koncentracijom citokinina inducira se rast aksilarnih pupova u pazušcima listova. Kada se izdanci razviju, mogu se presaditi na svježju podlogu i postupak se ponavlja dok se ne postigne traženi broj izdanaka koji se onda ukorjenjuju i prenose u zemlju (Jelaska, 1994). Prednosti metode aksilarnog grananja nad drugim su: metoda je općenito jednostavnija od drugih, stopa umnožavanja je visoka, genetska stabilnost uglavnom je očuvana te je rast tako dobivenih biljaka vrlo dobar (Jelaska, 1994).

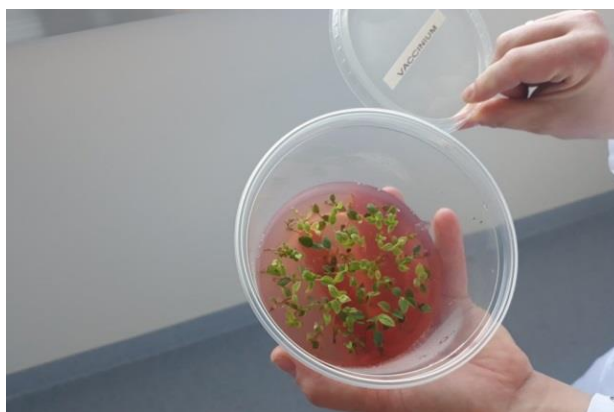
Uspješnost kulture stanica, tkiva ili organa ovisit će o izboru pogodnog sastava hranidbene podloge. Bez obzira na različitosti između hranidbenih medija koje se danas upotrebljavaju, sve one sadrže mineralne soli, ugljikohidrate kao izvor energije, vitamine i regulatore rasta.

Kulturom tkiva, odnosno „*in vitro*“ borovnicu razmnožavaju veliki moderni rasadnici u zapadnoj Europi i Americi. Metoda je ista kao i kod ostalih jagodastih voćaka sa nešto izmijenjenom hranjivom podlogom i režimom svijetlosti. (Slika 14)

Nedostatak sadnog materijala i njegova visoka cijena je jedan od razloga sporog širenja visokogrmolike borovnice.

Kao genetički heterozigotna vrsta, *Vaccinium* ne reproducira individue iz sjemena slične roditeljskim osobinama. Brusnica, borovnica i planinska brusnica tradicionalno se

propagiraju vegetativno, što im osigurava očuvanje željenih genetičkih karakteristika i brzo dostizanje rodnog potencijala. Postoji veliko zanimanje za uvođenje raznih vrsta *Vaccinium* u kulturu tkiva. Ova se tehnologija komercijalno koristi za masovnu klonsku reprodukciju određenih kultivara/klonova, hibridnu proizvodnju sjemena, održavanje germplazme bez patogena i održavanje *in vitro* biljaka testiranih na patogene (*inicijalni materijal – virus free*).



Slika 14. *In vitro* razmnožavanje borovnica (Izvor: Internet¹²)

Borovnice su raznovrsna grupa višegodišnjih, uglavnom listopadnih, šumskih grmova, koji rađaju plodove u grozdovima. Trenutno se komercijalno uzgaja pet velikih skupina borovnica: (1) niskogrmolika borovnica (*V. angustifolium* Ait., *V. myrtilloides* Michx., *V. boreale* Hall i Aald.); (2) visokogrmolika borovnica (*V. corymbosum* L.); (3) poluvisoka borovnica – hibrid ili povratni križanac visokogrmolike i niskogrmolike hibridizacije; (4) južna visokogrmolika borovnica, dobivena hibridizacijom *V. corymbosum* borovnica s jednom ili više vrsta (pretežito *V. darrowi* Camp i *V. ashei* Reade; Lyrene, 1990); i (5) borovnica ‘zečje oko’. Za propagaciju borovnica tradicionalno su se koristile reznice od mekog, polutvrdog i tvrdog drva, iako je razmnožavanje mikropropagacijom zahtjevnija i potencijalno učinkovitija metoda u oplemenjivanju borovnice.

Proliferacija aksilarnih pupoljaka - Iako su Barker i Collins (1963) uzgajali komade rizoma niskogrmolike borovnice na Whiteovom mediju bez dodavanja regulatora rasta, *in vitro* propagaciju vrste *Vaccinium* započeo je Lyrene (1978), kojeg su slijedili Cohen i Elliot (1979). Zatim su se razvile tehnike kulture tkiva za proizvodnju aksilarnih izdanaka visokogrmolike borovnice (Cohen, 1980; Zimmerman i Broome, 1980; Wolfe i sur., 1983; Grout i Reed, 1986; Eccher i Noè, 1989; Noè i Echer, 1994; Gonzalez i sur., 2000).

Nekoliko je recenzija (Smagula i Lyrene, 1984; George i sur., 1987; Zimmerman, 1991; Galletta i Ballington, 1996; Debnath, 2003a; Rowland i Hammerschlag, 2005) saželo *in vitro* kulturu borovnice. Većina tih oblika mikropropagacije uključuje kulture meristema gdje se koriste dijelovi stabljike koji sadrže ili apikalne ili lateralne pupoljke. Veliki problem u propagaciji borovnice je formacija neželjenih zadebljanja na bazi eksplantanata, kao i izbijanje spontanih adventivnih izdanaka (Zimmerman i Broome, 1980; Litwińczuk i Szczerba, 1998).

Eksplantati iz mladih biljaka donora prikladniji su za proliferaciju nego oni iz starijih biljaka donora (Lyrene, 1980). Odrvenjele reznice borovnice uzete su u zimu te površinski sterilizirane i pohranjene na nisku temperaturu. Pupanje i proliferacija reznice potiče se stavljanjem istih u vodu na $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ($20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom noći) s fotoperiodom 16 sati ($60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tijekom 15 dana) (Gonzalez i sur., 2000). Lateralni izdanci koji izbiju koriste se kao izvor eksplantata. Zeljaste reznice s polja (Gonzalez i sur., 2000), izdanci biljaka uzgajanih u stakleniku (Morrison i sur., 2000; Debnath, 2004), eksplantat s presadnica (Lyrene, 1980) i komadići rizoma (Barker i Collins, 1963) također su se koristili za *in vitro* propagaciju borovnice.

Optimalni sastav medija i regulatora rasta varira ovisno o genotipu borovnice. Lloydov i McCownov (1980) medij WPM pokazao se kao najbolji za mikropropagaciju kultivara 'Bluecrop' (Wolfe i sur., 1983). Zimmermanov i Broomeov uzvještaj (1980) spominje $22.8 \mu\text{M}$ IAA uz 73.8 Mm 2iP kao optimum u proliferaciji aksilarnih izdanaka. Niskogrmolika borovnica povećanjem koncentracije 2iP s 0 na $147.6 \mu\text{M}$ proizvodi sve više izdanaka (Frett i Smagula, 1983), tri klona visokogrmolikih borovnica proizvela su manji broj izdanaka na koncentraciji od $147.6 \mu\text{M}$ nego na nižim koncentracijama (Chandler i Draper, 1986). Neki istraživači rutinski koriste hladni tretman u tami na 4°C uz upotrebu 2iP za iniciranje rasta novih eksplantata (Orlikowska, 1986). Međutim, 2iP pokazuje fitotoksičnost pri visokim dozama, posebice u uspostavljanju kulture, kada puno eksplantata posmeđe i s vremenom odumre. Mješavine zeatina i 2iP nisu toliko fitotoksične kao sam 2iP te rezultiraju višim stopama inicijacije kulture (Eccher i Noè, 1989, Tablica 2.). Zeatin je učinkovitiji za inicijaciju izdanaka kod *Vaccinium* vrsta (Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991; Gonzalez i sur., 2000; Debnath, 2004) i za proliferaciju izdanaka visoko (Chandler i Draper, 1986; Eccher i Noè, 1989) i niskogrmolikih (Debnath, 2004) borovnica, iako su Gonzalez i sur. (2000) primijetili da se do najboljeg umnožavanja visokogrmolike borovnice dolazi s koncentracijom od $25 \mu\text{M}$ 2iP (Tablica 2.). Niska

koncentracija auksina djelotvorna je kada se dodaje indukcijskom mediju, na primjer 5.7 μM IAA (Morrison i sur., 2000). Međutim, Frett i Smagula (1983) su predložili da se u prijelaznom mediju prije ukorjenjivanja koristi samo 2iP. Koristeći modificirani medij borovnice s niskom razinom zeatina (2-4 μM) i saharoze (20g l⁻¹), Debnath (2004) je primijetio povišenu stopu (50 do 100 puta veću) umnožavanja *in vitro* izdanaka niskogrmolike borovnice tijekom 12-tjednog ciklusa. Svjetlo ima ključnu ulogu u morfogenezi *in vitro* kultura borovnice. Izdanci izloženi nižoj ozračenosti (15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) su rezultirali boljim zdravstvenim statusom niskogrmolike borovnice (Debnath, 2004). U usporedbi s kontrolnim tretmanom (55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) snažno svjetlo je imalo negativan učinak na *in vitro* proliferaciju izdanaka visokogrmolike borovnice (Noè i Eccher, 1994). Umnožavanje izdanaka može se poboljšati s subkultivacijom (Debnath, 2004).

Tablica 1. Proliferacija aksilarnih pupoljaka *in vitro* borovnice (Debnath, 2006.)

Vrsta	Hranjivi medij	Iniciranje izdanaka	Razmnožavanje izdanaka	Ukorjenjivanje	Reference
<i>V. corymbosum</i>	PMN	36.9 μM 2iP	36.9 μM 2iP	<i>Ex vivo</i> (4.9 mM IBA umakanje)	Noè i Eccher (1994)
<i>V. corymbosum</i>	WPM soli + MS vitamini	18 μM zeatin	25 μM 2iP	<i>Ex vitro</i>	Gonzales i ostali (2000)
<i>Vaccinium spp.</i>	Modificiran WPM	18.2 μM zeatin	24.6 μM 2iP	Nije definirano	Reed i Abdelnour-Esquivel (1991)

Regeneracija adventivnih izdanaka - Nickerson i Hall (1976) prvi su opisali oblikovanje zadebljanja (kalusa) kod *in vitro* kultura niskogrmolike borovnice na MS mediju s dodatkom 0.45 ili 2.26 μM 2,4 diklorofenoksiatske kiseline (2,4 -D). Nickerson (1978a) je također koristio eksplantate uzgojene na Nitschovom (1965) mediju s dodatkom 0.45 μM 2,4 -D i 0.46 μM kinetina da bi postigao rast. Rast izdanaka iz zadebljanja nije bio uspješan; višestruke formacije izdanaka su dobivene koristeći eksplantate presadnica i Andersonov (1975) medij s IAA i 2iP (Nickerson, 1978b; Tablica 3.). Zadebljanje je inducirano na borovnici ‘zečje oko’ (Lyrene, 1978); zadovoljavajuća regeneracija izdanaka iz nodijalnih segmenata regenerirana je od strane Hruskoci i Read-a (1993). Neke studije spominju uspjeh pri razvijanju mikropropagacije koristeći pupoljke koji nastanu na listovima borovnice (Billings i sur., 1988; Dweikat i Lyrene, 1988; Callow i sur., 1889; Rowland i Ogden, 1992; Cao i Hammerschlag, 2000; Cao i sur., 2002; Tablica 3.). Pozicija

lista na mladici utječe na regeneraciju izdanaka, tako mladi listovi u razvoju pokazuju veći morfogogenetski potencijal negoli stariji i potpuno razvijeni listovi. Cao i sur., (2002) otkrili su jednostavan i pouzdan postupak za visokofrekventnu regeneraciju izdanaka iz eksplantata lista ‘*Bluecrop*’ visokogrmolike borovnice, koji se oslanja na dva predtretmana i regeneraciju s TDZ u mediju. Maksimum od 98% eksplantata je regenerirao izdanke s prosjekom od 11 izdanaka po eksplantatu lista nakon 62 dan. Predtretman medij #1 (5 μ M TDZ i 2.6 μ M NAA tijekom 4 dana); predtretman medij #2 (7 μ M zeatinovog ribosida i 2.6 μ M NAA tijekom 3 dana); regenerativni medij (1 μ M TDZ tijekom 6 tjedana); i u konačnici medij bez regulatora rasta tijekom 10 dana.

Tablica 2. Regeneracija adventivnih izdanaka borovnice (Debnath, 2006.)

Vrsta	Tip eksplantata	Hranjivi medij	Regeneracija izdanaka	Elongacija izdanaka	Reference
<i>V. corymbosum</i>	List	WPM	10.0-15.0 μ M 2iP	Nije definirano	Billings i sur. (1988)
<i>V. corymbosum</i>	List	1/2 MS	5.0-25.0 μ M 2iP	25.0 μ M 2iP	Callow i sur. (1989)
<i>V. corymbosum</i>	List	Modificiran WPM	20.0 μ M ZR	24.6 μ M 2iP + 9.1 μ M zeatin	Rovland i Ogden (1992)
<i>V. corymbosum</i>	Stabljika	Z-2	25.0 μ M zeatin	Nije definirano	Hruskoci i Read (1993)
<i>V. corymbosum</i>	List	Modificiran WPM	20.0 μ M ZR, 1.0 μ M TDZ	Nema regulatora rasta biljaka (PGR)	Cao i Hammerschlag (2000)
<i>V. corymbosum</i>	List	Modificiran WPM	1.0 μ M TDZx	Nema regulatora rasta biljaka (PGR)	Cao i sur. (2002)
<i>V. corymbosum</i> <i>V. elliotii</i>	List	Modificiran Knop (1965)	24.6 μ M 2iP	24.6 μ M 2iP	Dweikat i Lyrene (1988)

Ukorjenjivanje i aklimatizacija - Proizvodnja *in vitro* biljaka završava se disekcijom *in vitro* izdanaka koji se zatim induciraju da proizvedu adventivno korijenje u *in vitro* ili *ex*

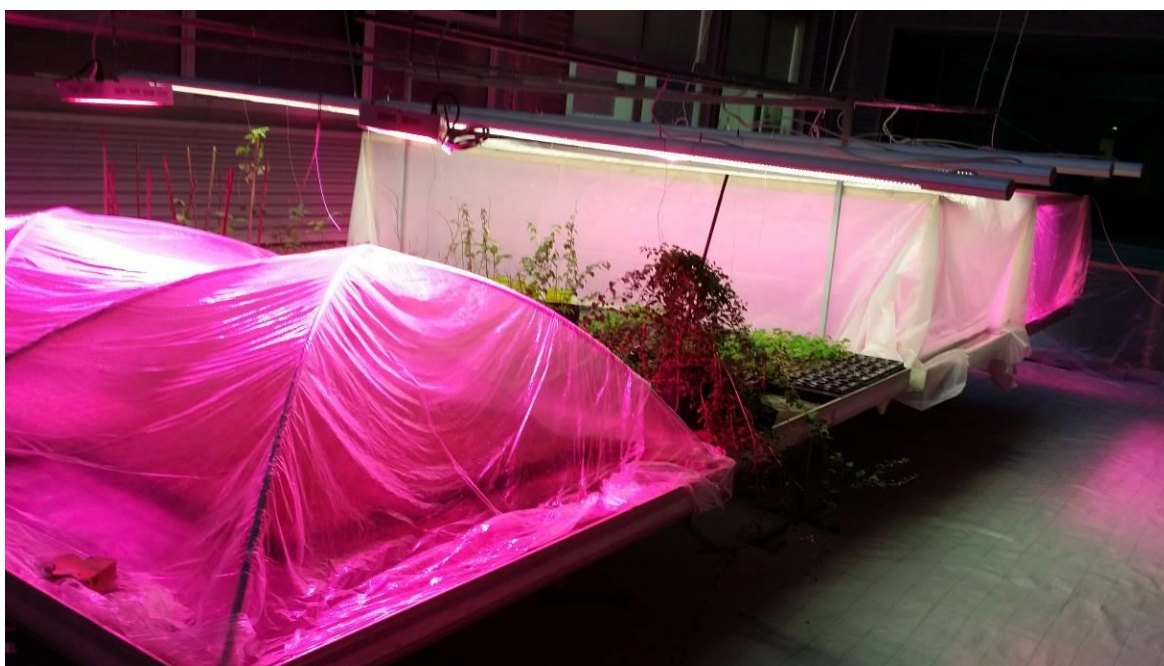
vitro uvjetima na kiselom supstratu poput 1 treseta :1 perlita (v/v Gonzalez i sur., 2000) i 4 treseta : 2 vermikulita : 1 perlita (v/v/v; Morrison i sur., 2000) bez predtretmana auksinom. Predtretman auksinom nije potreban za *ex vitro* ukorjenjivanje borovnica (Gonzalez i sur., 2000), iako je Debnath (2004) primijetio da je do ukorjenjivanja (85-95%) kod niskogrmolikih borovnica došlo kada su mikroizdanci bili uronjeni u 4.9 mM IBA prije sadnje u 2 treset : 1 perlit (v/v) supstrat. Što se tiče *ex vitro* ukorjenjivanja, mikroreznice se obično drže u komori s misterima u kojoj je vrlo visoka relativna vlažnost (95%), a nakon toga ih se prebacuje u staklenik (85% relativne vlažnosti) na aklimatizaciju. Ukorjenjivanje mikroreznica borovnice *ex vitro* može smanjiti troškove (Zimmerman, 1987), iako je sam proces obično sporiji nego *in vitro* (Wolfe i sur., 1983). *In vitro* ukorjenjivanje se može inducirati u mediju za proliferaciju izdanaka koji sadrži 1-2 μ M zeatina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva

Cilj ovoga diplomskog rada usmjeren je na ispitivanje mogućnost aklimatizacije i ukorjenjivanja, odnosno indukciji rizogeneze izdanaka (eksplantata) borovnice kultivara visokogmolike borovnice *Bluecrop* uporabom određenih hormona i tipa posuda sa supstratom.

Cjelokupno istraživanje provedeno je u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo na Fakultetu agrbiotehničkih znanosti Osijek. Katedra se prvenstveno bavi edukacijom studenata, znanstvenim istraživanjima, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij je opremljen svom opremom koja je potrebna za provođenje mikropropagacije (autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, laminar i dr.), matičnim biljnim materijalom (matičnjak) i nadasve prostorom za aklimatizaciju (Slika 15) te klima komora s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 16).



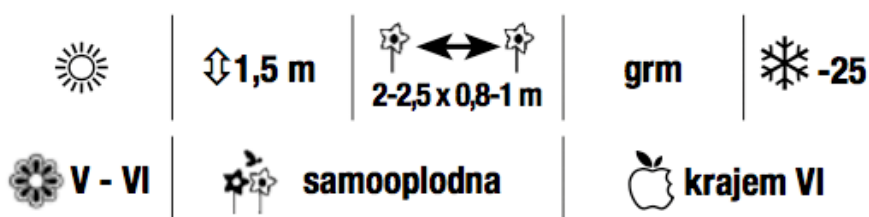
Slika 15. Matičnjak i aklimatizacija (Izvor: Malivuk, 2019)



Slika 16. Klima komora i biljni materijal u multiplikaciji (Izvor: Malivuk 2019.)

3.2. Kultivar u istraživanju

Bluecrop je stara sorta stvorena u SAD (Weymouth, New Jersey). Roditelji su GM-37 (Jersey x Pioneer) x CU-5 (Stanley x June). U proizvodnji je od 1952. godine i predstavlja najrašireniju sortu u svijetu zbog izražene adaptivnosti na različite pedoklimatske uvjete (Petrović i sur., 2007). Smatra se standard sortom za borovnicu. (Slika 17)



Slika 17. Karakteristike kultivara Bluecrop (Izvor: Internet)

Sazrijeva srednje rano. Grm je bujan, uspravan i vitalan, otporan na sušu, zimske mrazeve i uročnike bolesti. Može doseći visinu 1,6 – 1, m. Posjeduje visok potencijal rađanja, čak 4-6 kg po grmu. (Slika 18)



Slika 18. Bluecrop grm (Izvor: Internet¹³)

Grozd je rastresit, bobice su krupne (2,3 g), loptasto-kolačaste, svijetloplave boje i izražene čvrstoće (Milivojević, 2008) (Slika 19). Meso je kiselo, aromatično, umjerene kvalitete. Pokožica ne puca, bobice ne otpadaju. Dobro podnosi transport i čuvanje, također je pogodna za zamrzavanje.



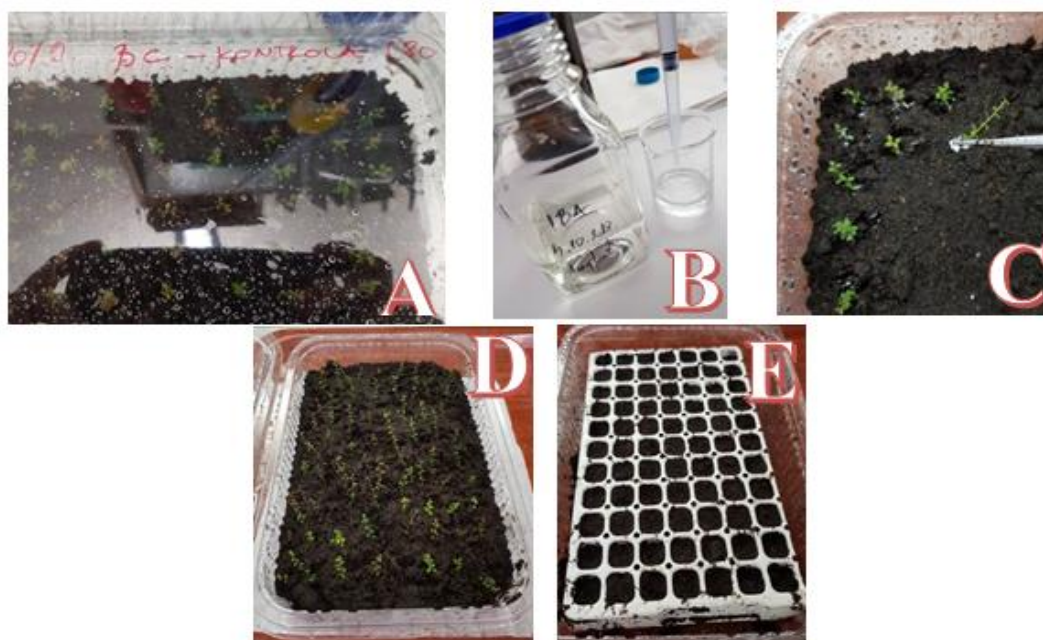
Slika 19. Bluecrop plod (Izvor: Internet¹⁴)

3.3. Tretmani u istraživanju

Tretmani su uključivali primjenu različitih biljnih hormona, odnosno regulatora rasta auksina koji se koriste u ukorjenjivanju zeljastih reznica (Slika 20.). Tri su tretmana korištena i to: kontrola koja je predstavljala klasični kiseli supstrat bez primjene hormona, zatim IBA koji je uključivao potapanje baze izdanka u otopinu koncentracije 1 mg/ml na 20 sekundi i odmah premještanje u posudu sa supstratom i kao zadnji tretman umakanje baze izdanka u praškasti hormon za zeljaste reznice na bazi derivat amida iz NAA komercijalnog naziva Germon (Tablica 4). Eksplantati su se prenosili u dva tipa posuda: sa već pripremljenim rupama dimenzija 1.5 x 1.5 cm (tretman - sa rupama) i posude, odnosno kontejnera bez rupa, dakle slobodna sadnja (tretman – bez rupa) (Slika 20.). Pretpostavka je da bih možebitno veći prostor za inicijaciju korijena (posuda bez rupa) rezultirao i boljim morfološkim parametrima korijena. Svaki tretman sadržavao je 50 biljaka, dakle $3 \times 50 = 150$ biljaka x 2 tipa posuda = 300 biljaka po cijelom pokusu.

Tablica 3. Tretmani u istraživanju

Tretman	Koncentracija	Tip posude sa supstratom
Kontrola	Bez hormona, čisti supstrat	Bez rupa / Sa rupama
IBA	1 mg/ml, 20 sekundi	Bez rupa / Sa rupama
Prah - Germon	Umakanje baze reznice u praškastu tvar	Bez rupa / Sa rupama



Slika 20. Tretmani u istraživanju: A – kontrola, B – IBA, C – Prah, D – posuda bez rupa, E – posuda s rupama. (Izvor: Malivuk, 2019)

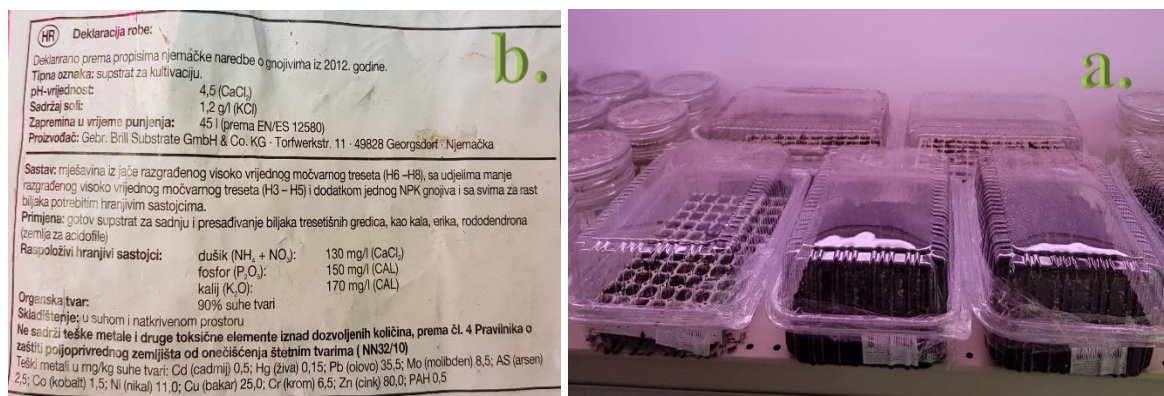
3.4. Priprema eksplantata, disekcija i prenošenje izdanaka na supstrat (*ex vitro*)

Eksplantati izvorno potječu sa *in vitro* biljaka kultivara Bluecrop koje su uvedene u kulturu tkiva prethodnih godina i na kojima se vrše ostala istraživanja druge tematike u mikropropagaciji borovnice. Izdanci koji su dostigli veličinu veću od 3 cm pažljivo su disecirani od baze. Potom su tretirani s pojedinim tretmanima i pincetom pažljivo uneseni u pojedine posude sa supstratom (Slika 21.). Korišten je supstrat Terra Brill pH vrijednosti 4.5 (CaCl_2) sastavljen od mješavine jače i manje razgrađenog močvarnog treseta s dodatkom NPK gnojiva (Slika 22a.)



Slika 21. Disekcija eksplantata, primjena tretmana i prenošenje u *ex vitro* uvjete
(Izvor: Bošnjak, 2019.)

Posude i izdanci na supstratu su zatim poprskani s vodom i zatvoreni (improvizirani zaštićeni prostor) u cilju zadržavanja povoljnog režima vlage od 90% koji je potreban u početnoj rizičnoj fazi aklimatizacije (Slika 22b.). Posude s biljkama se stavljene u klima komoru na temperaturu od 24°C, fotoperiod 16/8 i intenzitet svjetlosti od 3500 lux-a. Nakon 35 dana pristupilo se evaluaciji, odnosno mjerenju promatranih parametara uspješnosti aklimatizacije i ukorjenjivanja izdanaka borovnice.



Slika 22. a. - deklaracija korištenog supstrata; b. - aklimatizacija izdanaka u klima komori
(Izvor: Malivuk, 2019.)

3.5. Mjerenja u istraživanju

U ovom istraživanju promatrali smo utjecaj pojedinih tretmana i tipova posude sa supstratom na sljedeće stopu rizogeneze kroz evaluacijsku skalu (tablica 5.) i morfološke parametre uspješnosti aklimatizacije i ukorjenjivanja borovnice:

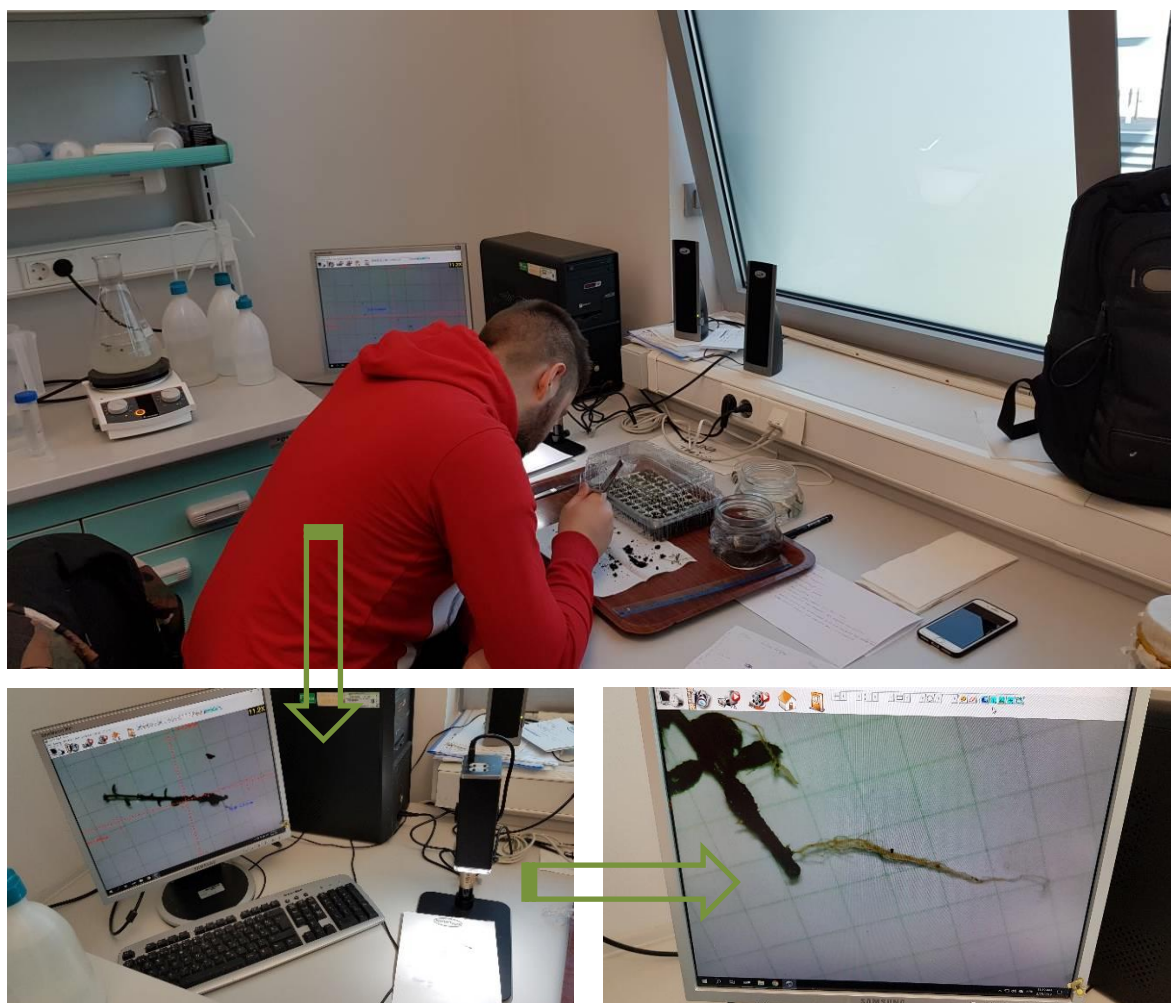
- ✓ Veličina izdanka
- ✓ Dužina korjenčića
- ✓ Broj korjenčića
- ✓ Razvijenost korijena prema evaluacijskoj skali

Evaluacijska skala je kreirana na sljedećim promatranim parametrima (tablica 5.):

Tablica 5. Evaluacijska skala razvijenosti korijenovog sustava borovnice *ex vitro*.

Karakteristika razvijenost korijenovog sustava	Skala
✓ Izdanak bez vidljivih korjenčića	1
✓ Nekoliko (1 – 3) kratkih korjenčića	2
✓ 4 – 5 korjenčića, neki se bočno granaju, bez formiranja korijenove bale (2 – 4 cm dužine)	3
✓ Srednja veličina korijenovog sustava, sadrži 6 – 10 korjenčića koji se bočno granaju i formiraju korijenovu balu (4 – 5 cm dužine)	4
✓ Dobro razvijen i razgranati korijenov sustav koji formira korijenovu balu (preko 10 korjenčića)	5

Promatranje i mjerenje navedenih morfoloških parametara korijena provedeno je pomoću ViTiny UM12 Long Working Distance 5MP USB Digitalnog mikroskopa (Slika 23.). Mikroskop posjeduje i licencirani UM12 Application software pomoću kojeg se direktno mjeri: duljina ili dužina/veličina promatranog objekta, kružnice polumjera, promjer, površina, kut, usporedba fotografija, itd.



Slika 23. Mjerenja morfoloških parametara USB mikroskopom (Izvor: Bošnjak, 2019.)

3.6. Obrada podataka

Rezultati dobivenih podataka provedenih u ovom istraživanju analizirani su statističkim metodama obrade podataka pomoću Microsoft Office Excel 2013, SAS Software 9.3., programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA). Od statističkih metoda korištena je analiza varijance (ANOVA), kao i statistički testovi značajnosti za primijenjene tretmane, odnosno F-test i Fisher's LSD (*engl.* Least Significant Difference) u vrijednosti razine od $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

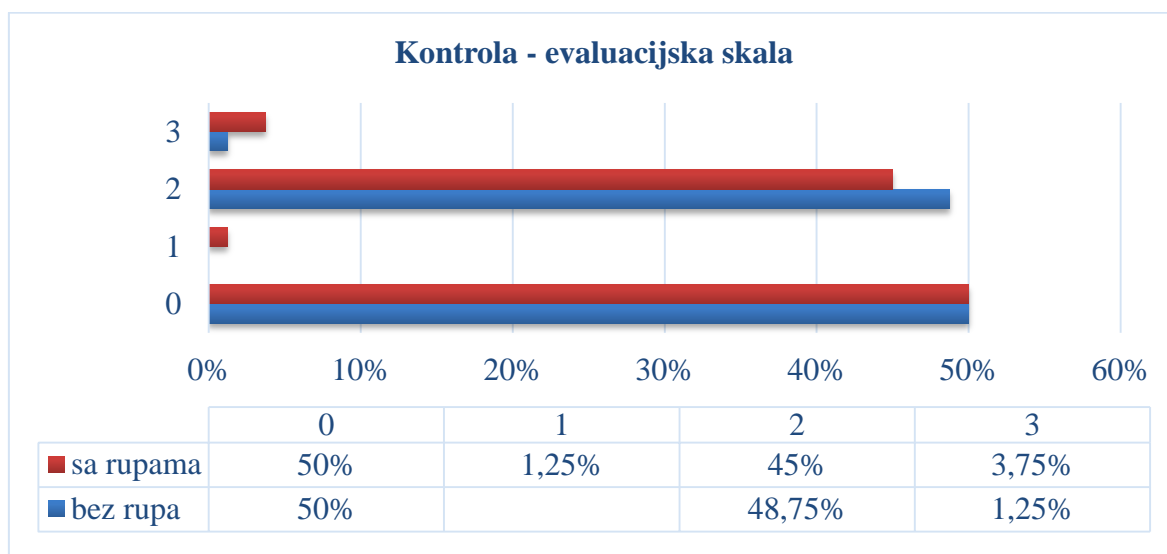
4.1. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – Kontrola

Tretman – Kontrola rezultirao je uspješnom aklimatizacijom i s vidno ukorijenim izdancima koji su nastavili rast i izdužili se tijekom 35 dana na oba tipa posude sa supstratom (Slika 24.).



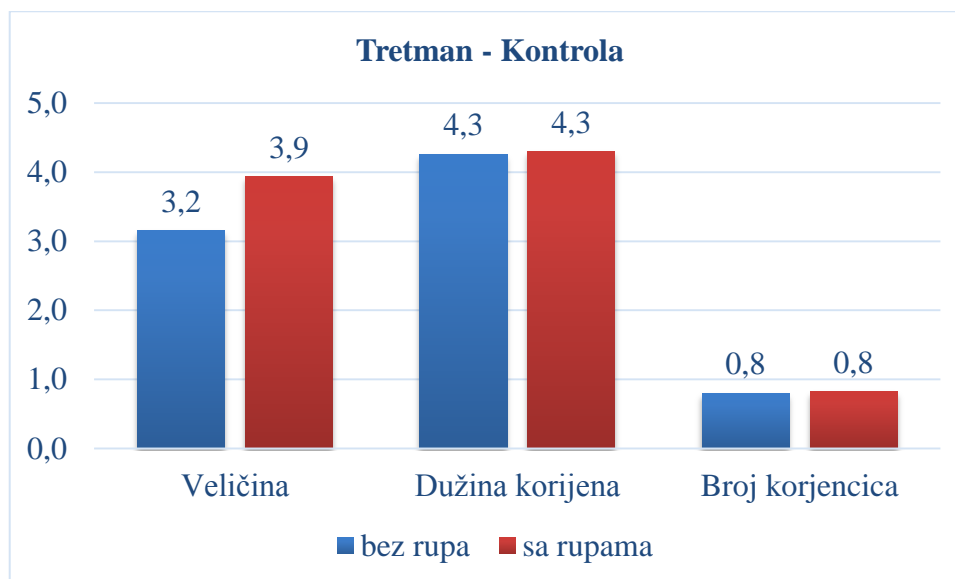
Slika 24. Tretman – Kontrola nakon 35 dana (Izvor: Bošnjak, 2019.)

Kao što je vidljivo iz grafikona 4., uspješnost rizogeneze je 50%, odnosno polovica izdanaka bilo je bez vidljivih korjenčića (skala - 0) na oba tipa posude. Najviše izdanaka, odnosno njih 45 do 49% rezultiralo je sa nekoliko (1 do 3) kratkih korjenčića (skala = 2, sa rupama 45%, bez rupa 48.75%). Svega je nekoliko izdanaka (sa rupama 3.75%, bez rupa 1.25%) rezultiralo s 4 do 5 korjenčića, gdje se neki granaju, ali bez formiranja korijenove bale (2 – 4 cm dužine).



Grafikon 4. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman - Kontrola

Eksplantati koji su bili u posudi sa supstratom sa rupama rezultirali su nešto većom visinom izdanka dok je dužina i broj korjenčića jednak u oba tipa posude (Grafikon 5.).



Grafikon 5. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman - Kontrola

4.2. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – IBA

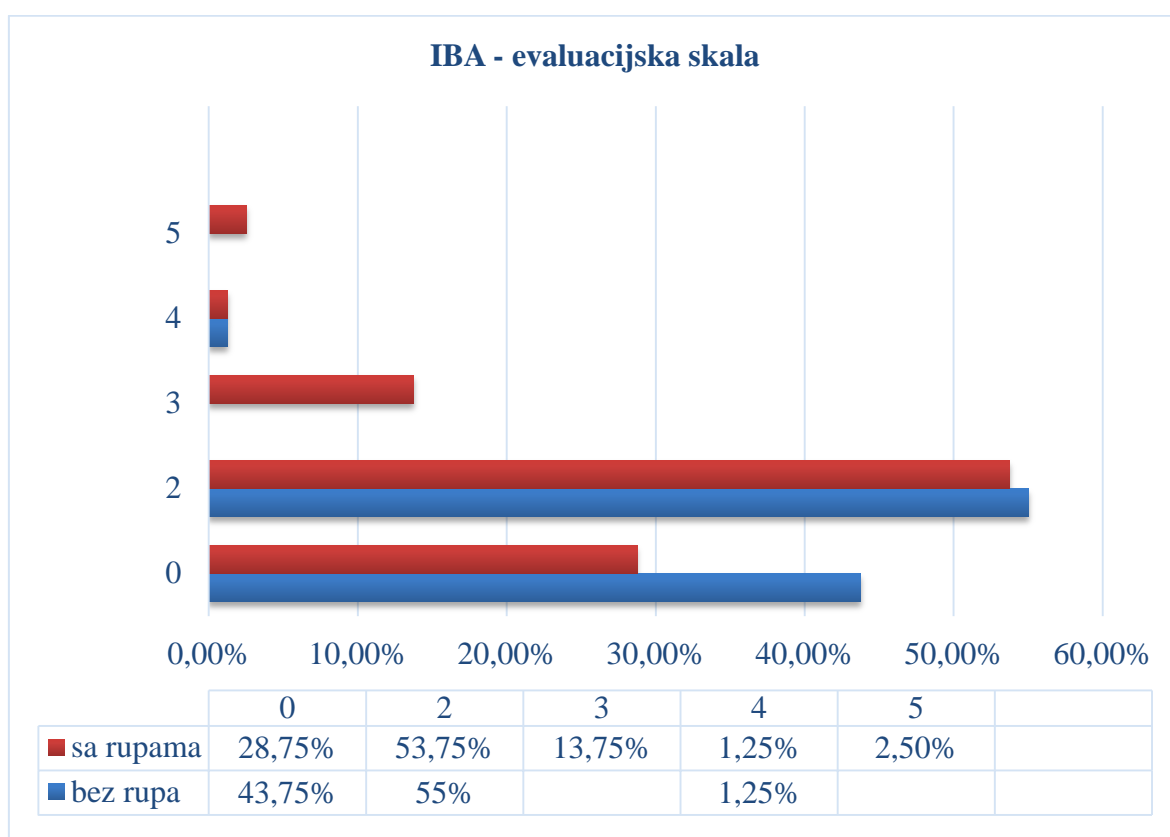
Tretman – IBA također je rezultirao uspješnom aklimatizacijom i s vidno ukorijenjenim izdancima koji su nastavili rast i izdužili se tijekom 35 dana na oba tipa posude sa supstratom (Slika 25.).



Slika 25. Tretman – IBA nakon 35 dana (Izvor: Bošnjak, 2019.)

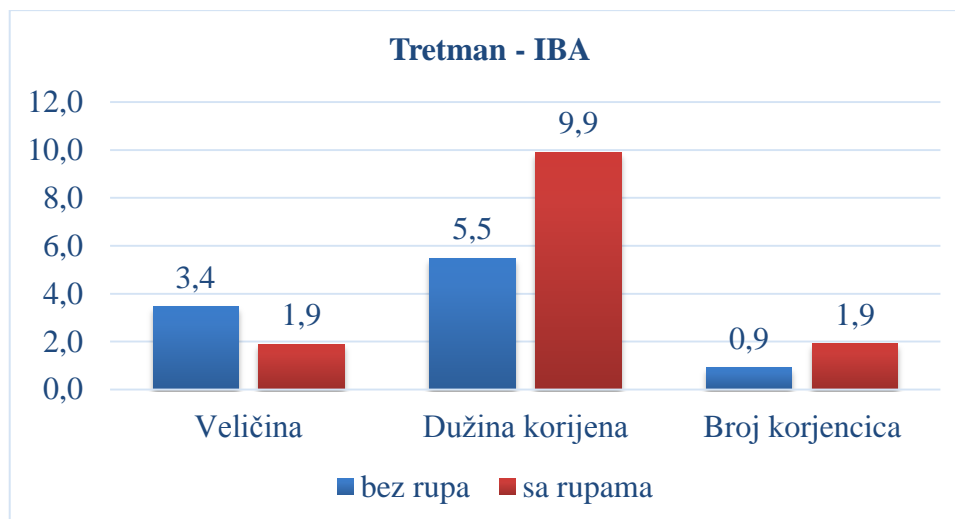
Prema grafikonu 6. uspješnost rizogeneze na tretmanu – IBA nešto je bolja u odnosu na prethodi tretman – kontrola. Posude sa rupama rezultirale su većim brojem ukorijenjenih izdanaka, odnosno 71.25% dok je tretman bez rupa rezultirao sa 56.25% ukorijenjenih

izdanaka. Prema evaluacijskoj skali najviše ukorijenjenih izdanaka njih 54 – 55% iniciralo je nekoliko (1 do 3) kratkih korjenčića (skala = 2, sa rupama 53.75%, bez rupa 55%). Izdanci koji su bili u posudama sa rupama njih 13.75% razvilo je 4 – 5 korjenčića, neki su se bočno granali ali bez formirane korijenove bale (2 – 4 cm dužine / skala 3). Svega 1.25% izdanaka razvilo na oba tipa posude srednju veličinu korijenovog sustava koja sadrži 6 – 10 korjenčića i koji se bočno granaju te formiraju korijenovu balu (4 – 5 cm dužine / skala – 4). Tretman s rupama jedini je ispoljio 2.5% ukorijenjenih izdanaka koji su prema evaluacijskoj skali 5 inicirali dobro razvijen i razgranati korijenov sustav koji formira korijenovu balu (preko 10 korjenčića).



Grafikon 6. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman - IBA

Što se tiče morfoloških parametara (grafikon 7.), izdanci koji su se nalazili u posudama s rupama inicirali su veću dužinu (9.9) i broj korjenčića (1.9) u odnosu na izdanke u posudama bez rupa (5.5 i 0.9). Jedino je dužina izdanaka u posudama bez rupa (3.4) bila veća u odnosu na izdanke koji su bili u posudama s rupama (1.9).



Grafikon 7. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman - IBA

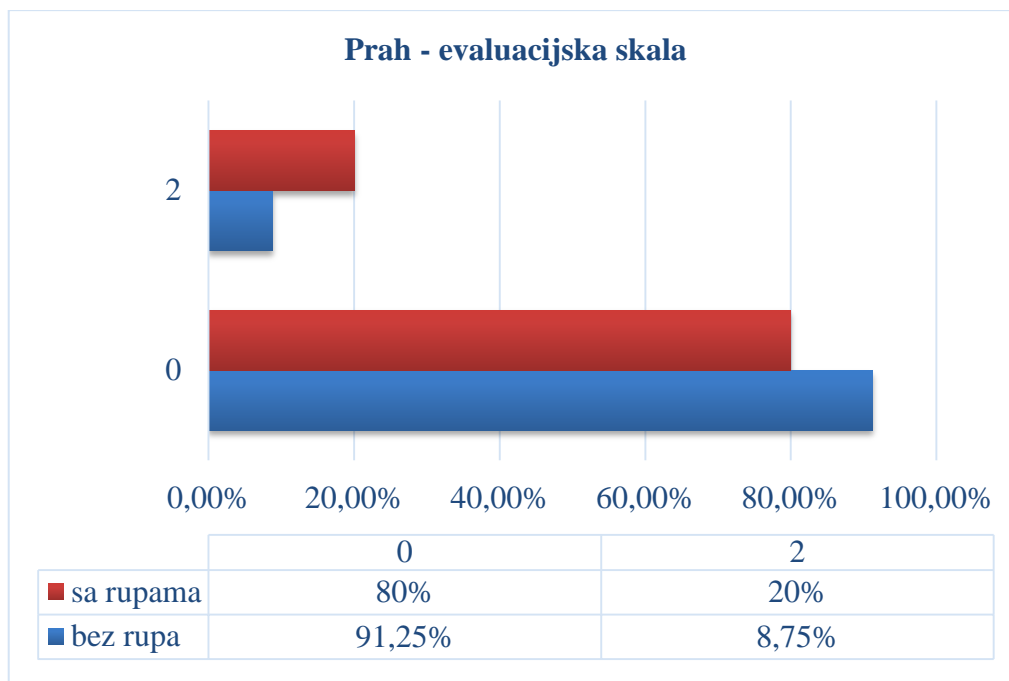
4.3. Rezultati uspješnosti rizogeneze na tretmanu – Prah

Tretman – prah rezultirao je vrlo lošom rizogenezom, kao što je vidljivo na slici 26. vrlo malo izdanaka se izdužilo ali su i dalje ostali vitalni, odnosno zeleni.



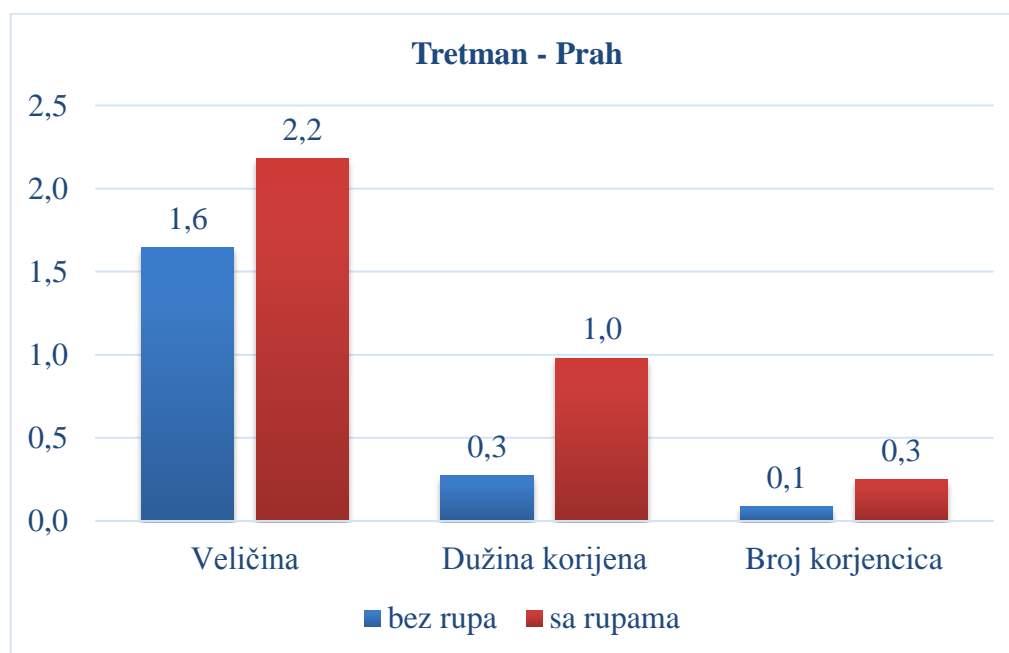
Slika 26. Tretman – Prah nakon 35 dana (Izvor: Bošnjak, 2019.)

Prema evaluacijskoj skali (grafikon 8.) zabilježena je najlošija rizogeneza (80 do 91% ne ukorijenjenih izdanaka). Tek je nekolicina izdanaka inducirala nekoliko (1 – 3) kratkih korjenčića (bez rupa 8.75% i sa rupama 20%).

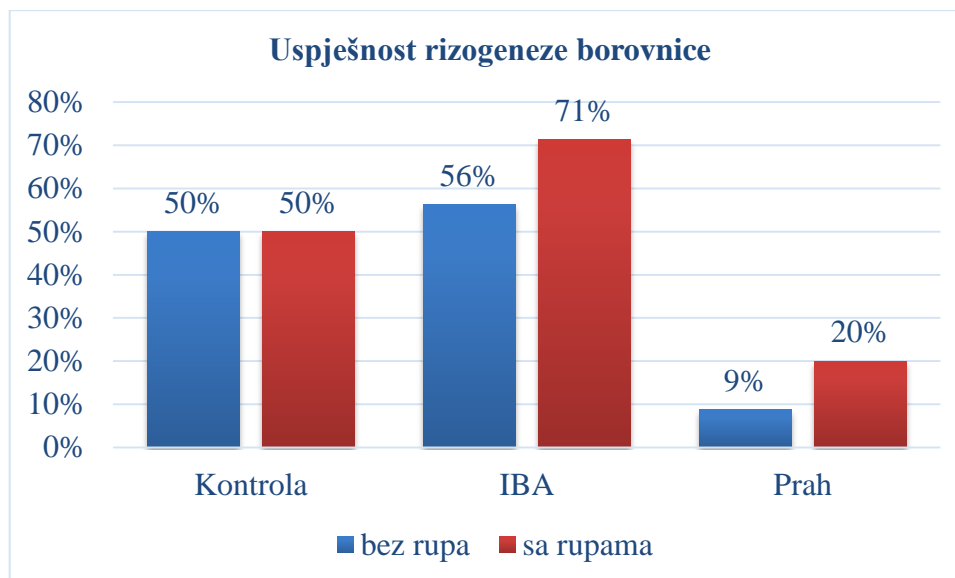


Grafikon 8. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman – Prah

Rezultati morfoloških parametara za tretman – prah ukazuju veću veličinu izdanka (2.2), dužinu korijena (1.0) i broj korjenčića (0.3) na izdancima koji su se nalazili u posudama sa rupama (grafikon 9.).



Grafikon 9. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman - Prah



Grafikon 10. Uspješnost rizogeneze borovnice po svim tretmanima

Prema grafikonu 10. najuspješnija rizogeneza u rasponu od 56 do 71% inducirao je tretman s hormonom IBA (T2 – IBA). Zatim tretman kontrola gdje nije primijenjen nikakav auksin (hormon) u indukciji korijenja (50%), a daleko najlošiji tretman od svega 9 do 20 % ukorijenjenih izdanka rezultirao je tretman s aplikacijom praha.

5. RASPRAVA

Na razini cijelog pokusa (Tablica 6.) najveće, odnosno najduže izdanke rezultirao je tretman kontrola (1.62) koji je bio značajno veći u odnosu na oba ostala tretmana. Tretman IBA rezultirao je značajno većim izdancima (0.87) u odnosu na tretman s prahom (0.75). Ostali morfološki parametri dužina korjenčića (7.06), broj korjenčića (1.23) i uspješnost rizogeneze po evaluacijskoj shemi (1.14) kod tretmana IBA značajno su bolji u odnosu na sve ostale tretmane. Pozitivan učinak u rizogenezi koji se veže za IBA može biti u njegovoj većoj stabilnosti u odnosu na IAA i sporom transportu od mjesta aplikacije koja je u bazi izdanka i njezinoj pretvorbi u IAA u izdanku (Ludwig-Müller 2000., Štefančić i sur., 2007). Debnath (2007.) navodi učinke IBA na ukriješćivanje brusnice gdje iznosi da IBA nije neophodna u indukciji korijenja ali je povećala dužinu izdanaka i broj listova po izdanku. U našem istraživanju IBA je ipak inicirala razvitak značajno boljeg korijenovog sustava u odnosu na sve ostale tretmane ali veličina izdanka nije bila značajna u odnosu na kontrolni tretman bez upotrebe hormona (kontrola).

Tablica 6. Statističke razlike na razini pokusa između: tretmana (kontrola, IBA, prah), tipova posuda (bez rupa, sa rupama) te interakcija tretman x posude za promatrane parametre uspješnosti ukorjenjivanja borovnice Bluecrop (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i evaluacijska shema).

<i>Tretman</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
Kontrola	1.62 ^A	3.65 ^B	0.64 ^B	0.72 ^B
IBA	0.87 ^B	7.06 ^A	1.23 ^A	1.14 ^A
Prah	0.75 ^C	3.40 ^C	0.58 ^C	0.41 ^C
<i>F-test</i>	53.17	64.73	45.99	56.81
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Posude				
Bez rupa	2.75	3.33 ^B	0.60 ^B	0.78 ^B
Sa rupama	2.66	5.06 ^A	0.99 ^A	1.04 ^A
<i>F-test</i>	0.39	11.57	14.17	8.56
<i>p</i>	0.5327	0.0007	0.0002	0.0036
Interakcija tretman x tip posude				
<i>F-test</i>	32.98	7.26	8.45	3.26
<i>p</i>	<.0001	0.0008	0.0002	0.0391

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Tretman T3 koji je uključivao upotrebu hormon za zeljaste reznice na bazi praha (derivat amida iz NAA) rezultirao je značajno lošijim rezultatima po pitanju svih promatranih parametara u odnosu na ostale tretmane (IBA i kontrola). Pretpostavka je kako zastupljena koncentracija hormona u sredstvu (Germon) nije povoljna ili derivati amida iz NAA nisu učinkoviti za indukciju korijenja kod borovnice u *ex vitro* uvjetima.

Što se tiče razlika između korištenih posuda sa supstratom (Tablica 6.), tretman koji je uključivao primjenu posuda sa rupama rezultirao je značajno boljom dužinom korjenčića (5.06), brojem korjenčića (0.99) i uspješnosti rizogeneze prema evaluacijskoj shemi (1.04) u odnosu na tretman koji je uključivao posudu bez rupa. Nije zabilježena značajna razlika između primijenjenih posuda na parametra visina izdanka.

Interakcija tretman hormonom x korišteni tip posude značajna je za sve promatrane parametre.

5.1. Razlike između tretmana citokininima unutar korištenog tipa posude

Kod posuda koje su bile bez rupa (Tablica 7.) tretman koji je uključivao upotrebu citokinina na bazi praha rezultirao je značajno lošijim rezultatima u odnosu na ostale tretmane za sve promatrane parametre. Tretman IBA rezultirao je boljim rezultatima promatranih parametara u odnosu na tretman kontrola ali ta razlika po LSD testu (*F-test*) nije bila značajna.

Tablica 7. Razlike između tretmana (kontrola, IBA, prah) na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema) za posude bez rupa.

<i>Bez rupa</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
Kontrola	3.16 ^A	4.26 ^A	0.80 ^A	1.01 ^A
IBA	3.45 ^A	5.47 ^A	0.90 ^A	1.15 ^A
Prah	1.65 ^B	0.27 ^B	0.09 ^B	0.18 ^B
<i>F-test</i>	46.27	30.03	21.59	27.11
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Posude koje su uključivale pojedinačne rupe ili sadna mjesta (sa rupama) inicirale su značajno veće izdanke na tretmanu kontrola koji nije uključivao aplikaciju hormona u odnosu na oba ostala tretmana hormonom. Kontrastno dužina korjenčića, broj korjenčića i uspješnost rizogeneze prema evaluacijskoj shemi (Tablica 8.).

Tablica 8. Razlike između tretmana (kontrola, IBA, prah) na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema) za posude sa rupama.

<i>Sa rupama</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
Kontrola	2.04 ^A	5.60 ^B	1.07 ^B	0.68 ^B
IBA	0.77 ^B	8.92 ^A	1.65 ^A	1.30 ^A
Prah	0.68 ^B	3.31 ^C	0.57 ^C	0.46 ^C
<i>F-test</i>	40.73	38.76	29.33	32.33
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

5.2. Razlike između korištenih posuda sa supstratom po tretmanima

Tretman IBA rezultirao je značajno boljim parametrima dužine korjenčića (9.90), brojem korjenčića (1.90) i uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj shemi (1.70) kod posuda koje su uključivale individualno rupe (Tablica 9., Slika 27.). Jedino su izdanci koji su se nalazili u posudama koje nisu imale rupe rezultirale značajno većom visinom izdanaka (3.45).

Tablica 9. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana IBA na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).

<i>IBA</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
Bez rupa	3.45 ^A	5.47 ^B	0.90 ^B	1.15 ^B
Sa rupama	1.89 ^B	9.90 ^A	1.90 ^A	1.70 ^A
<i>F-test</i>	53.49	12.87	14.96	9.80
<i>p</i>	<.0001	0.0004	0.0002	0.0021

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$



Slika 27. Tretman IBA s rupama (Izvor: Bošnjak, 2019.)

Posude koje su uključivale rupe na tretmanu kontrola (Tablica 10., Slika 28.) rezultirale su značajno većim izdancima (3.94) u odnosu na posudu bez rupa. Nije zabilježena značajna razlika između posuda za ostale parametre (dužina i broj korjenčića, evaluacijska shema uspješnosti rizogeneze).

Tablica 10. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana kontrola na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).

<i>Kontrola</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
<i>Bez rupa</i>	3.15 ^B	4.26	0.80	1.01
<i>Sa rupama</i>	3.94 ^A	4.29	0.82	1.01
<i>F-test</i>	6.59	0.00	0.02	0.00
<i>p</i>	0.0112	0.9647	0.8898	0.9992

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$



Slika 28. Tretman Kontrola s rupama (Izvor: Bošnjak, 2019.)

Kod tretmana koji je uključivao primjenu praškastog hormona (Prah) svi promatrani parametri značajno su bolji na posudama sa rupama (Tablica 11.).

Tablica 11. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana prah na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).

<i>Prah</i>	<i>Veličina izdanka</i>	<i>Dužina korijena</i>	<i>Br. korjenčića</i>	<i>Shema</i>
<i>Bez rupa</i>	1.65 ^B	0.27 ^B	0.09 ^B	0.17 ^B
<i>Sa rupama</i>	2.18 ^A	0.98 ^A	0.25 ^A	0.40 ^A
<i>F-test</i>	22.00	4.99	5.00	4.17
<i>p</i>	<.0001	0.0269	0.0268	0.0428

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$



Slika 29. Tretman Prah s rupama (Izvor: Bošnjak, 2019.)

6. ZAKLJUČAK

Sve je veći interes proizvođača u RH za intenzivnim uzgojem borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) što zbog svojih visoko kvalitetnih nutritivnih osobina ploda koje utječu na zdravlje tako i interesa za politike potpora EU i RH te visoke otkupne cijene bobica u odnosu na neko drugo intenzivno voće. Uslijed navedenog u našoj zemlji zabilježena je povećana potreba za kvalitetnim sadnim materijalom borovnice. Borovnica se komercijalno razmnožava odrvenjelim i poluodrvenjelim reznicama te kulturom tkiva *in vitro*. Vegetativno razmnožavanje borovnice putem kulture tkiva *in vitro*, odnosno mikropropagacijom predstavlja vrlo efikasan i učinkoviti model masovne proizvodnje zdravih i uniformnih biljaka u vrlo kratkom vremenskom ciklusu koji ne ovisi o vremenskim uvjetima. Mnogi istraživači navode da biljke borovnice proizašle *in vitro* tehnikom rezultiraju bujnijim porastom, odnosno vigorom tijekom eksploatacije u nasadu. Na uspjeh mikropropagacije utječu starost i zdravstveno stanje biljke, sezonski karakter, tehnika razmnožavanja i uvjeti okoliša. Među unutarnjim čimbenicima, biljni hormon auksin je dominantan regulator u razvoju korijena. Neki kultivari borovnice mogu spontano inicirati korijenje na izdancima, dok drugi kultivari zahtijevaju egzogeno nanošenje auksina kao promotora rizogeneze.

Modifikacija protokola u propagaciji borovnice s ciljem skraćivanja faze ukorjenjivanja/rizogeneze i faze aklimatizacije spajanjem u jednu zajedničku fazu, znatno smanjuje ciklus proizvodnje čak za tri do pet tjedana. Za razliku od nekih drugih voćnih kultura koje zahtijevaju potpuno odvojene faze ukorjenjivanja ili rizogeneze na polučvrstom mediju kod borovnice ove faze se mogu spojiti u jednu zajedničku *ex vitro* fazu gdje se rizogeneza odvija direktno u supstratu za, odnosno tijekom aklimatizacije.

Općenito *ex vitro* ukorjenjivanje vrlo je korisna i efikasna procedura koja može znatno smanjiti troškove u mikropropagaciji ali i smanjiti potrebno vrijeme za adaptaciju korijena na supstrat. Poznato je da promjene u odnosu između koncentracije auksina i citokinina mogu dovesti do promjena u razvoju i funkcionalnosti biljke. Auksini se obično primjenjuju tijekom rizogeneze jer potječu indukciju novih korjenčića.

U ispitivanju mogućnosti ukorjenjivanja i aklimatizacije borovnice u ovom istraživanju ispitivali smo utjecaj različitih hormona auksina i posuda sa supstratom na uspješnost rizogeneze i aklimatizaciju borovnice te došli do sljedećih zaključaka:

- Indukcija adventivnih korjenčića ključni je korak uspješnosti vegetativne propagacije.
- Ukorjenjivanje reznica određeno je složenom interakcijom unutarnjih i okolišnih čimbenika.
- Naši rezultati sugeriraju obećavajuću upotrebu auksina u ukorjenjivanju borovnice i srodnih vrsta kultivara *Bluecrop* i njegovu praktičnu primjenu u rasadničarskoj proizvodnji.
- Uspješnost rizogeneze na kontrolnom tretman 50%, izdanci u posudama sa rupama nešto veći.
- Uspješnost rizogeneze na IBA tretmanu bolja u odnosu na tretman kontrola, posude sa rupama rezultirale većim brojem ukorijenjenih izdanaka (71.25%), izdanci koju su se nalazili u posudama s rupama inicirali su veću dužinu i broj korjenčića.
- Najlošija rizogeneza na tretmanu Prah 9 – 20% ukorijenjenih izdanaka, veća veličinu izdanka, dužinu korijena i broj korjenčića na izdancima koji su se nalazili u posudama sa rupama.
- Najveće, odnosno najduže izdanke rezultirao je tretman kontrola koji je bio značajno veći u odnosu na oba ostala tretmana.
- Tretman IBA rezultirao je značajno većim izdancima u odnosu na tretman s prahom. Ostali morfološki parametri dužina korjenčića, broj korjenčića i uspješnost rizogeneze po evaluacijskoj shemi kod tretmana IBA značajno su bolji u odnosu na sve ostale tretmane.
- Tretman koji je uključivao upotrebu hormon za zeljaste reznice na bazi praha (derivat amida iz NAA) rezultirao je značajno lošijim rezultatima po pitanju svih promatranih parametara, pretpostavka je kako zastupljena koncentracija hormona u sredstvu (Germon) nije povoljna ili derivati amida iz NAA nisu učinkoviti u indukciju rizogeneze kod borovnice u *ex vitro* uvjetima.
- Tretman koji je uključivao primjenu posuda sa rupama rezultirao je značajno boljom dužinom korjenčića, brojem korjenčića i uspješnijom rizogenezom prema evaluacijskoj shemi u odnosu na tretman koji je uključivao posudu bez rupa.
- Nije zabilježena značajna razlika između primijenjenih posuda na parametra visina izdanka.
- Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanja učinka drugih koncentracija IBA i evaluacije istih na drugim kultivarima visokogrmolike borovnice.

7. POPIS LITERATURE

- Anonymus 1, (2008): Springer <http://www.springer.com/us/book/9781402063510>.
Pristupljeno 20.08.2019.
- Anonymus 2, (2014): Micropropagation. Battistini vivai
<http://www.battistinivivai.com/en/micropropagazione.php>. Pristupljeno 20.08.2019.
- Ballington, J.R. (2009): The role of interspecific hybridization in blueberry improvement.
Acta Horticulturae. 49-57.
- Barker, W.G. i W.B. Collins. (1963): The blueberry rhizome: *In vitro* culture. *Can. J. Bot.*
41:1325-1329.
- Billings, S.G., C.K. Chin, i G. Jelenkovic. (1988): Regeneration of blueberry plantlets from
leaf segments. *HortScience* 23:763-766.
- Brisette, L., L. Tremblay, i D. Lord. (1990): Micropropagation of lowbush blueberry from
mature field-grown plants. *HortScience* 25:349-351.
- Burg, K., Helmersson, A., Bozhkov, P., von Arnold, S. (2007): Developmental and genetic
variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *J.*
Exp. Bot., 317-319.
- Callow, P., K. Haghghi, M. Giroux, i J. Hancock. (1989): *In vitro* shoot regeneration on
leaf tissue from micropropagated highbush blueberry. *HortScience* 24:373-375.
- Cao, X. i F.A. Hammerschlag. (2000): Improved shoot organogenesis from leaf explants of
highbush blueberry. *HortScience* 35:945-947.
- Cao, X., F.A. Hammerschlag, i L. Douglass. (2002): A two-step pretreatment significantly
enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv.
Bluecrop. *HortScience* 37:819-821.
- Chandler, C.K. i A.D. Draper. (1986): Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of
three highbush blueberry clones *in vitro*. *HortScience* 21:1065-1066.
- Cohen, D. (1980): Application of micropropagation methods for blueberries and tamarillos.
Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:144-146.
- Cohen, D. i D. Elliot. (1979): Micropropagation methods for blueberries and tamarillos.
Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 29:177-179.
- Debnath S.C. (2005): Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant
orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using
zeatin. *HortScience*, 40: 185–188.

- Debnath S.C. (2006): Propagation of *Vaccinium* in Vitro, International Journal of Fruit Science, 6:2, 47-71
- Debnath S.C. (2007): Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of in vitro and ex vitro-derived lowbush blueberry plants. Plant Growth Regulation, 51: 245–253.
- De Klerk G.-J., Der Krieken W., De Jong J. (1999): The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 35: 189–199.
- Duralija B., Dujmović Purgar D., Šindrak Z., Voća S., Šnajder I., Vokurka A. (2007): Bioraznolikost voćnih vrsta u Republici Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 2. Hrvatskog botaničkog kongresa, Zagreb, 20-21.
- Dweikat, M. i P.M. Lyrene. (1988): Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured *in vitro*. HortScience 23:629.
- Eccher, T. i N. Noè. (1989): Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Acta Hort. 441: 185-190.
- Eccher, T., N. Noè, C. Piagnani, i S. Castellis. (1986): Effects of increasing concentrations of BAP and 2iP on *in vitro* culture of *Vaccinium corymbosum*. Acta Hort. 179II:879-881.
- Ehlenfeldt, M.K. i Martin Jr., R.B. (2009): Seed set, fruit weight, and yield in highbush (*Vaccinium corymbosum* L.) Blueberry cultivars 'Duke' and 'Bluecrop'. Acta Hort. 810, 93-96.
- El-Shiekh, A., D.K. Wildung, J.J. Luby, K.L. Sargent, i P.E. Read. (1996): Long-term effects of propagation by tissue culture or softwood single-node cuttings on growth habit, yield, and berry weight of 'Northblue' blueberry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:339-342.
- Frett, J.J. i J.M. Smagula. (1983): *In vitro* shoot production of lowbush blueberry. Can. J. Plant Sci. 63:467-472.
- Galletta, G.J. i J.R. Ballington. (1996): Blueberries, cranberries and lingonberries, pp. 1-107. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). Fruit breeding. Vol. II, Vine and small fruit crops. Prentice Hall, New York.
- George, E.F., D.J.M. Puttock, i H.J. George. (1987): Plant culture media, vol. 1. Exergetics Ltd., Edington.

- Gonzalez, M.V., M. Lopez, A.E. Valdes, i R.J. Ordas. (2000): Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137:73-78.
- Grout, J.M. i P.E. Reed. (1986): Influence of stock plant propagation method on tissue culture and leaf-bud propagation of 'Northblue' blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:368-371.
- Grout, J.M., P.E. Reed, i D.K. Wildung. (1986): Influence of tissue culture and leaf-bud propagation on the growth habit of 'Northblue' blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:372-375.
- Hong, V. i R.E. Wrolstad. (1990): Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* 38:708-515.
- Hruskoci, J.B. i P.E. Read. (1993): *In vitro* shoot regeneration from internode segments and internode-derived callus of blueberry (*Vaccinium spp.*). *Acta Hort.* 346:127-132.
- Jelaska S. (1994). *Kultura biljnih stanica i tkiva: temeljna istraživanja i primjena*. Zagreb, Školska knjiga.
- Litwińczuk, W. i J. Szczerba. (1998): The growth and development of highbush blueberry cultures (*Vaccinium corymbosum* L. Cv. Bluecrop) under different light sources. *Acta Physiol. Plant. (suppl.)* 20:24.
- Litwińczuk W., Zubel A. (2005): Growth *in vitro* cultures of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) depending on different photoperiods. *Folia Horticulturae*, 36-41.
- Lloyd, G. i B. McCown. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Lohachoompol, V., Szrednicki, G., Craske, J. (2004): The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 248-252.
- Lyrene, P.M. (1980) Micropropagation of rabbiteye blueberries. *HortScience* 15:80-81.
- Luby, J.J., Ballington, J.R., Draper, A.D., Pliszka, K., Austin, M.E. (1990): Blueberries and Cranberries (*Vaccinium*). In: *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*, 341-456
- Ludwig-Müller J. (2000): Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, 32: 219–230.

- Ludwig-Müller J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1757–1773.
- McCown, B.H. i E.L. Zeldin. (2005): *Vaccinium spp.* cranberry, pp. 247-261. In: R.E. Litz (ed.). *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI Publ., Wallingford.
- Meiners J., Schwab M., Szankowski I. (2007): Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 676: 169–176.
- Milivojević, J. (2008): Pomološka i antioksidativna svojstva plodova jagodastih voćaka. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Morrison, S., J.M. Smagula, i W. Litten. 2000. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 35:738-741.
- Mratinić, E., Kojić, M. (1998): Samonikle vrste voćaka Srbije. Institut za istraživanja u poljoprivredi „Srbija“, Beograd, 17-19.
- Murashige, T. i F. Skoog. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nickerson, N.L. (1978a): Callus formation in lowbush blueberry fruit explants *in vitro*. *Hort. Res.* 18:85-91.
- Nickerson, N.L. (1978b): *In vitro* shoot formation in lowbush blueberry seedling explants. *HortScience* 13:698.
- Nickerson, N.L. i I.V. Hall. (1976): Callus formation in stem internode sections of lowbush blueberries cultured on a medium containing plant growth regulators. *Hort. Res.* 16:29-35.
- Nikolić, M., Milivojević, J., Leposavić, A., (2009): Berry production in Serbia- present and future. Programme and abstracts, COST863 Workshop, 16
- Nitsch, J.P. 1965. Culture *in vitro* de tissus de fruits. III. Mesocarpe et endocarpe de Pêche. *Bull. Soc. Fr.* 112:22-25.
- Noè N. i T. Eccher. (1994): Influence of irradiance on *in vitro* growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting *in vivo*. *Physiol. Plant.* 91:273-275.
- Orlikowska, T. (1986): Micropropagation of highbush blueberry. *Fruit Sci. Rep.* 13:105-115.
- Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010): Auxin control of root development. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 2: a001537.

- Petrović, S., Lepasavić, A., Veljković, B., (2007): Kupina i borovnica. Institut za voćarstvo, Čačak i Istraživačko razvojni centar „Ljekobilje“ d.o.o., Trebinje
- Read, P.E., D.K. Wildung, i C.A. Hartley. (1989): Field performance of *in vitro*-propagated ‘Northblue’ blueberries. Acta Hort. 241:191-194.
- Reed, B.M. i A. Abdelnour-Esquivel. (1991): The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. HortScience 26:1320-1322.
- Rowland, L.J. i F.A. Hammerschlag. (2005): *Vaccinium spp.* blueberry, pp. 222-246. In: R.E. Litz (ed.). Biotechnology of fruit and nut crops. CABI Publ., Wallingford.
- Rowland, L.J. i E.I. Ogden. (1992): Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry. HortScience 27:1127-1129.
- Sapers, G. i D. Hargrave. (1987): Proportions of individual anthocyanins in fruits of cranberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:100-104.
- Serres, R. i B. McCown. (1994): Rapid flowering of microcultured cranberry plants. HortScience 29:159-161.
- Smagula, J.M. i P.M. Lyrene, (1984): Blueberry, pp. 383-401. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada (eds.). Handbook of plant cell culture, vol. 3. Macmillan, New York.
- Smolarz, K. i D. Chiebowska. (1997): Growth vigour and yielding of highbush blueberry cv. Bluecrop propagated from semi-woody cuttings and *in vitro*. J. Fruit Ornment. Fruit Res. 5:53-60.
- Stark, R., I.V. Hall, i P.A. Hendrickson. (1978): The partridgeberry of Newfoundland. Canadex (Hort. Crops) 230.
- Strik B., Fisher G., Hart J., Ingham R., Kaufman D., Penhallegon R., Pscheidt J., William R., Brun C., Ahmedullah M., Antonelli A., Askham L., Bristow P., Havens D., Scheer B., Shanks C., Barney D. (1993): Highbush Blueberry Production Guide. Oregon State University, Corvallis, USA.
- Szajdek, A., Borowska, E.J. (2008): Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods Human Nutrition, 147-156
- Štefančič M., Štampar F., Veberič R., Osterc G. (2007): The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock ‘Gisela 5’ leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. Scientia Horticulturae, 112: 399–405
- Vander Kloet, S.P. (1988): The Genus *Vaccinium* in North America. Res. Branch Agric. Can. Publ. 1828.

- Wolfe, D.E., P. Eck, i C. Chin. (1983): Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. HortScience 18:703-705.
- Zec, G., Čolić, S., Todorović, R., Marinković, D. (2001): Ožiljavanje visokožbunaste borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) zrelih renicama. Jugoslavensko voćarstvo, 35, 135-136, 117-123
- Zimmerman, R.H. (1987): Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. Acta Hort. 227:489-499.
- Zimmerman, R.H. (1991): Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops, pp. 231-246. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic, Amsterdam.
- Zimmerman, R.H. i O.C. Broome. (1980): Blueberry micropropagation, pp. 44-47. In: Proc. Conf. on Nursery Prod. of Fruit Plants Through Tiss. Cult.- Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE-11.

Internet izvori:

1. <http://svijet-pare.com/ostale/113-borovnica.html>, 3.8.2019
2. https://en.wikipedia.org/wiki/File:Vaccinium_myrtilloides_berries.jpg, 3.8.2019
3. https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_angustifolium#/media/File:Vaccinium_angustifolium_Pancake_Bay_PP.jpg, 4.8.2019
4. <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:261823-2>, 4.8.2019
5. <https://www.gardenia.net/plant/Vaccinium-ashei>, 5.8.2019
6. <https://www.goodfruit.com/blueberry-trees/>, 5.8.2019
7. https://www.123rf.com/photo_85189828_blueberry-leaf-isolated.html, 5.8.219
8. http://www.borovnice-viretum.hr/VIRETUM_BOROVNICE/O_borovnici.html, 5.8.2019
9. <http://www.svijetokonas.net/borovnica-mali-plod-ali-velikog-ucinka-na-zdravlje/>, 4.8.2019
10. http://www.zdravasrbija.com/images/zs_zs_ZS_rez1.jpg, 4.8.2019
11. https://www.borovnica.org/wp-content/uploads/2019/05/razmnozavanje_borovnice_12-1024x675.jpg, 4.8.2019
12. <https://www.rasadnik-milic.hr/proizvodi/sadnice-bobicastog-voca/bluecrop/>, 6.8.2019

13. <https://www.plantingtree.com/products/bluecrop-blueberry-bush>, 6.8.2019
14. <https://www.starkbros.com/products/berry-plants/blueberry-plants/bluecrop-blueberry>, 4.8.2019
15. <https://optolov.ru/hr/remont-v-kvartire/kak-poseyat-golubiku-iz-semyan-vyrashchivanie-golubiki-iz-semyan-v-domashnih.html>, 3.8.2019

8. SAŽETAK

Vegetativno razmnožavanje borovnice putem kulture tkiva *in vitro*, odnosno mikropropagacijom predstavlja vrlo efikasan i učinkoviti model masovne proizvodnje zdravih i uniformnih biljaka u vrlo kratkom vremenskom ciklusu koji ne ovisi o vremenskim uvjetima. Među unutarnjim čimbenicima uspješnosti mikropropagacije biljni hormon auksin je dominantan regulator u razvoju korijena. Modifikacija protokola u propagaciji borovnice s ciljem skraćivanja faze ukorjenjivanja/rizogeneze i faze aklimatizacije spajanjem u jednu zajedničku fazu, znatno smanjuje ciklus proizvodnje čak za tri do pet tjedana. Indukcija adventivnih korjenčića ključni je korak uspješnosti vegetativne propagacije. Naši rezultati sugeriraju vrlo veliku učinkovitost upotrebe auksina IBA u ukorjenjivanju borovnice. Dužina korjenčića, broj korjenčića i uspješnost rizogeneze po evaluacijskoj shemi kod tretmana IBA značajno je bolja u odnosu na sve ostale tretmane (kontrola i prah). Tretman koji je uključivao primjenu posuda sa rupama rezultirao je značajno boljom dužinom korjenčića, brojem korjenčića i uspješnijom rizogenezom prema evaluacijskoj shemi u odnosu na tretman koji je uključivao posudu bez rupa. Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanja učinka drugih koncentracija i evaluacije IBA na rizogenezu drugih kultivara visokogrmolike borovnice *in vitro*.

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, ukorjenjivanje, aklimatizacija, IBA

9. SUMMARY

Vegetative propagation of blueberries by tissue culture *in vitro* or micropropagation is a very efficient and effective model of mass production of healthy and uniform plants in a very short time cycle that is independent of weather conditions. Among the internal factors of micropropagation success, the plant hormone auxin is the dominant regulator in root development. Modification of the blueberry propagation protocol to shorten rooting / rhizogenesis and acclimatization phases by merging them into one common phase significantly reduces the production cycle of three to five weeks. Induction of adventitious roots is a key step in the success of vegetative propagation. Our results suggest the very high efficiency of IBA auxin use in rooting blueberries. Root length, number of rhizomes and the success of rhizogenesis according to the evaluation scheme of IBA treatments are significantly better than all other treatments (control and powder). Treatment involving the use of pots with holes resulted in significantly better root length, number of rootlets and more successful rhizogenesis according to the evaluation scheme compared to the treatment that included a pot without holes. Further research focus examining on the effect of others concentration and evaluation IBAs on rhisogenesis other highbush blueberry cultivars *in vitro*.

Key words: blueberry, micropropagation, rooting, acclimatization, IBA

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Kemijski sastav ploda borovnice.....	4
Tablica 2. Proliferacija aksilarnih pupoljaka in vitro borovnice.....	28
Tablica 3. Regeneracija adventivnih izdanaka borovnice.....	29
Tablica 4. Tretmani u istraživanju.....	34
Tablica 5. Evaluacijska skala razvijenosti korijenovog sustava borovnice ex vitro.....	36
Tablica 6. Statističke razlike na razini pokusa između: tretmana (kontrola, IBA, prah), tipova posuda (bez rupa, sa rupama) te interakcija tretman x posude za promatrane parametre uspješnosti ukorjenjivanja borovnice Bluecrop (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i evaluacijska shema).....	44
Tablica 7. Razlike između tretmana (kontrola, IBA, prah) na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema) za posude bez rupa.....	45
Tablica 8. Razlike između tretmana (kontrola, IBA, prah) na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema) za posude sa rupama.....	46
Tablica 9. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana IBA na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).....	46
Tablica 10. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana kontrola na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).....	47
Tablica 11. Razlike između posuda (bez rupa i sa rupama) unutar tretmana prah na promatrane parametre (veličina izdanka, dužina korijena, broj korjenčića i shema).....	48

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Borovnica.....	3
Slika 2. Kanadska gorka niskogrmolika borovnica.....	6
Slika 3. Niskogrmolika borovnica.....	7
Slika 4. Sjeverna visokogrmolika borovnica.....	8
Slika 5. Borovnica „zečje oko“	9
Slika 6. Obična borovnica.....	10
Slika 7. Koriijen borovnice.....	11
Slika 8. Stablo borovnice.....	12
Slika 9. List borovnice.....	13
Slika 10. Cvijet borovnice.....	14
Slika 11. Plod borovnice.....	15
Slika 12. Sjeme borovnice.....	21
Slika 13. Razmnožavanje zrelim reznicama.....	23
Slika 14. <i>In vitro</i> razmnožavanje borovnica.....	26
Slika 15. Matičnjak i aklimatizacija.....	31
Slika 16. Klima komora i biljni materijal u multiplikaciji.....	32
Slika 17. Karakteristike kultivara Bluecrop.....	32
Slika 18. Bluecrop grm.....	33
Slika 19. Bluecrop plod.....	33
Slika 20. Tretmani u istraživanju: A – kontrola, B – IBA, C – Prah, D – posuda bez rupa, E – posuda s rupama.....	34

Slika 21. Disekcija eksplantata, primjena tretmana i prenošenje u ex vitro uvjete.....	35
Slika 22. a. - deklaracija korištenog supstrat; b. - aklimatizacija izdanaka u klima komori	35
Slika 23. Mjerenja morfoloških parametara USB mikroskopom.....	37
Slika 24. Tretman – Kontrola nakon 35 dana.....	38
Slika 25. Tretman – IBA nakon 35 dana.....	39
Slika 26. Tretman – Prah nakon 35 dana.....	41
Slika 27. Tretman IBA s rupama.....	47
Slika 28. Tretman Kontrola s rupama.....	48
Slika 29. Tretman Prah s rupama.....	49

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Proizvodnja borovnice u svijetu od 1961 do 2017 god.....	16
Grafikon 2. Karta proizvodnje borovnice.....	17
Grafikon 3. Top 20 zemalja proizvodnje borovnice u 2017 godini.....	17
Grafikon 4. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman – Kontrola.....	38
Grafikon 5. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman – Kontrola.....	39
Grafikon 6. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman – IBA.....	40
Grafikon 7. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman – IBA.....	41
Grafikon 8. Rezultati uspješnosti rizogeneze po evaluacijskoj skali za tretman – Prah.....	42
Grafikon 9. Rezultati promatranih morfoloških parametara za tretman – Prah.....	42
Grafikon 10. Uspješnost rizogeneze borovnice po svim tretmanima.....	43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Voćarstvo

Diplomski rad

AKLIMATIZACIJA I UKORJENJIVANJE BOROVNICE (*Vaccinium corymbosum L.*) *EX VITRO*

Marko Malivuk

Sažetak: Vegetativno razmnožavanje borovnice putem kulture tkiva *in vitro*, odnosno mikropropagacijom predstavlja vrlo efikasan i učinkoviti model masovne proizvodnje zdravih i uniformnih biljaka u vrlo kratkom vremenskom ciklusu koji ne ovisi o vremenskim uvjetima. Među unutarnjim čimbenicima uspješnosti mikropropagacije biljni hormon auksin je dominantan regulator u razvoju korijena. Modifikacija protokola u propagaciji borovnice s ciljem skraćivanja faze ukorjenjivanja/rizogeneze i faze aklimatizacije spajanjem u jednu zajedničku fazu, znatno smanjuje ciklus proizvodnje čak za tri do pet tjedana. Indukcija adventivnih korjenčića ključni je korak uspješnosti vegetativne propagacije. Naši rezultati sugeriraju vrlo veliku učinkovitost upotrebe auksina IBA u ukorjenjivanju borovnice. Dužina korjenčića, broj korjenčića i uspješnost rizogeneze po evaluacijskoj shemi kod tretmana IBA značajno je bolja u odnosu na sve ostale tretmane (kontrola i prah). Tretman koji je uključivao primjenu posuda sa rupama rezultirao je značajno boljom dužinom korjenčića, brojem korjenčića i uspješnijom rizogenezom prema evaluacijskoj shemi u odnosu na tretman koji je uključivao posudu bez rupa. Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanja učinka drugih koncentracija i evaluacije IBA na rizogenezu drugih kultivara visokogrmolike borovnice *in vitro*.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Broj stranica: 66

Broj grafikona i slika: 39

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 73

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: borovnica, mikropropagacija, ukorjenjivanje, aklimatizacija, IBA

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Brigita Popović, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Dejan Agić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University graduate study, course Pomology

Graduate work

ACCLIMATIZATION AND ROOTING OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) EX VITRO

Marko Malivuk

Abstract: Vegetative propagation of blueberries by tissue culture in vitro or micropropagation is a very efficient and effective model of mass production of healthy and uniform plants in a very short time cycle that is independent of weather conditions. Among the internal factors of micropropagation success, the plant hormone auxin is the dominant regulator in root development. Modification of the blueberry propagation protocol to shorten rooting / rhizogenesis and acclimatization phases by merging them into one common phase significantly reduces the production cycle of three to five weeks. Induction of adventitious roots is a key step in the success of vegetative propagation. Our results suggest the very high efficiency of IBA auxin use in rooting blueberries. Root length, number of rhizomes and the success of rhizogenesis according to the evaluation scheme of IBA treatments are significantly better than all other treatments (control and powder). Treatment involving the use of pots with holes resulted in significantly better root length, number of rootlets and more successful rhizogenesis according to the evaluation scheme compared to the treatment that included a pot without holes. Further research focus examining on the effect of others concentration and evaluation IBAs on rhisogenesis other highbush blueberry cultivars *in vitro*.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Number of pages: 66

Number of figures and pictures: 39

Number of tables: 11

Number of references: 73

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: blueberry, micropropagation, rooting, acclimatization, IBA

Reviewers:

1. Brigita Popović, Ph.D., assoc.prof., president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D.full.prof., mentor
3. Dejan Agić, asst.prof., member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.